Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei *Aspergillus niger*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

einer Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Richard Schober

aus Pforzheim

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1929

Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei *Aspergillus niger*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

einer Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Richard Schober
aus Pforzheim

Leipzig
Gebrüder Borntraeger
1929

Dekan: Prof. Dr. Kommerell.
Referent: Prof. Dr. Lehmann.

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1929.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik. Bd. 72. Heft 1.
Gebrüder Borntraeger, Leipzig

Einleitung.

Die Anregung zu dieser Arbeit ergab sich aus einem von Herrn Prof. Dr. Oehlkers im Tübinger Botanischen Institut abgehaltenen mykologischen Kursus, wobei beobachtet wurde, daß ein daselbst frisch isolierter *Aspergillus niger* auf einem sehr stickstoffarmen Kieselsäuregallertboden im Thermostaten ein beträchtliches Myzelwachstum aufwies, während zwei andere ebenfalls frisch isolierte *Aspergillus niger*-Rassen unter denselben Bedingungen viel weniger Myzel erzeugten. Eine Wiederholung dieser Versuche, wobei die Stickstoffarmut des Nährbodens dadurch gesteigert wurde, daß die Kieselsäuregallerte mit besonderer Sorgfalt aus einwandfreien Chemikalien hergestellt war, und wobei außerdem durch Aufstellung von flachen Schalen mit konzentrierter Schwefelsäure der event. im Thermostaten vorhandene Ammoniakstickstoff der Luft absorbiert werden sollte, ergab wiederum dasselbe Resultat. Betont sei, daß sich dieser zweite Nährboden auch nicht als völlig stickstoffrei erwies, doch immerhin so wenig Stickstoff enthielt, daß es zunächst unerklärlich war, warum der eine *Aspergillus* mit so geringen Spuren auskommen sollte, die beiden anderen aber nicht. Da nun die Kieselsäuregallerte stickstoffreicher war als ihre Ausgangsmaterialien, was sich auf die zu ihrer Herstellung benutzten Dialysierhülsen zurückführen ließ, war die Verwendung flüssiger Nährböden geboten, deren Stickstoffspuren noch weitaus geringer waren, so daß sie für eine Ernährung des Pilzes überhaupt nicht mehr in Frage kamen. Diese Nährlösungen enthielten 10 % Glukose, 1 % Kalziumkarbonat und die Mineralsalze, wie ich sie späterhin auch zu meinen Versuchen benutzt habe, und deren Zu-

sammensetzung aus dem methodischen Teil zu ersehen ist. Wiederum ergab sich, daß der eine Pilz in 4 Wochen ein Myzel von 80 mg Trockengewicht bildete, während der zweite nur ein solches von 18 mg erzeugte und der dritte überhaupt kaum keimte. Vorläufig blieb nur die Annahme übrig, daß die Pilze in verschiedener Weise zur Assimilation atmosphärischen Stickstoffs fähig sind; denn es war sonst nicht einzusehen, warum dem einen Pilz die vorhandenen Stickstoffspuren zu einem Myzelerntegewicht von 80 mg ausreichen sollten, und die beiden anderen unter denselben Bedingungen viel weniger oder überhaupt kaum ein Myzel zu bilden vermochten.

Über die Assimilation elementaren Stickstoffs durch Schimmelpilze und auch insbesondere durch *Aspergillus niger* liegt eine umfassende Literatur vor. Für die älteren Arbeiten sei auf Vogel (1906), für die späteren auf Duggar und Davis (1916) verwiesen, womit sich eine eingehende Schilderung dieser nicht mehr aktuellen Arbeiten erübrigt. Zusammengefaßt läßt sich jedenfalls sagen, daß die Untersuchungen der Assimilierbarkeit freien Stickstoffs durch *Aspergillus niger* beinahe ebensoviel negative wie positive Befunde ergeben haben; man beurteilte darum bis heute alle Resultate mehr oder weniger skeptisch. So schreiben Benecke-Jost in ihrer Pflanzenphysiologie (Bd. 1, 1924, S. 398): „ob neuere Arbeiten in sicherer Weise die Stickstoffbindung bei Schimmelpilzen erwiesen haben, sei dahingestellt", und Czapek in seiner Biochemie (Bd. 2, 1925, S. 192): „da es sich in diesen wie in späteren Arbeiten oft um Stickstoffdifferenzen von wenigen Milligrammen, ja Bruchteile von Milligrammen handelt, wo man mindestens zweifeln kann, ob diese Unterschiede nicht in die methodischen Fehlergrenzen fallen, ist große Zurückhaltung gegenüber solchen positiven Behauptungen am Platze". Weniger skeptisch sagt Kostytschew in seinem Lehrbuch der Pflanzenphysiologie (Bd. 1, 1926, S. 215) darüber aus: „daß man sich auch den negativen Resultaten gegenüber mit einiger Reserve verhalten müsse, da solche in Laboratoriumsversuchen zuweilen auch mit Organismen erhalten werden, welche den Stickstoff bestimmt assimilieren können". Derselbe Autor meint weiter, daß man nur mit frisch isolierten Pilzen arbeiten oder wenigstens die Pilzkulturen einer Bodenpassage vorher unterziehen müsse. Daraus geht hervor, daß die Frage der Stickstoffassimilation durch Schimmelpilze noch durchaus offen ist.

Im Laufe meiner hier mitgeteilten Untersuchungen ließ sich die Fähigkeit des *Aspergillus niger*, atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren, mit voller Sicherheit nachweisen und zugleich eine Aufklärung darüber gewinnen, von welchen Faktoren dieser Prozeß überhaupt abhängig ist. Die Einsicht in diese Bedingungen ergab zugleich die Möglichkeit, die in der Literatur vorliegenden Resultate endgültig zu beurteilen und das Problem der Luftstickstoffassimilation für *Aspergillus niger* vollständig aufzulösen. Außerdem bildet sie aber auch zugleich die Basis für die Beurteilung eines weiteren physiologischen Problems. Es zeigte sich schon bei den ersten Versuchen, daß durch das Fehlen gebundenen Stickstoffs die Säureproduktion des Pilzes in andere Bahnen gelenkt wird, als sie in normalen Kulturen abzulaufen pflegt, und daß dadurch gleichzeitig das Myzelwachstum in weitestgehendem Maße beeinflußt wird. Gleich bei Beginn der Untersuchungen fiel die hohe Azidität auf, die schon die geringsten Myzelmengen in den Nährlösungen erzeugten. Genauere Experimente orientierten sehr bald darüber, daß das gegenseitige quantitative Verhältnis der einzelnen Säuren wie auch die Säuremenge selbst eine nachdrücklichste Veränderung unter den Bedingungen der Luftstickstoffassimilation erfahren hat.

Somit ergab sich als zweiter Teil der Arbeit die Frage, ob sich mit der Methode der stickstoffreien Kulturen eine besser fundierte Einsicht in den physiologischen Ablauf der Säurebildung bei *Aspergillus niger* gewinnen läßt, als es die bisher vorliegenden Untersuchungen ergeben hatten. Der Vorgang der Säurebildung war in den letzten Jahren das Objekt eingehender Studien von Wehmer, Molliard, Falk und Kapur, Currie, Butkewitsch, Kostytschew und Bernhauer gewesen, ohne daß es bis jetzt gelungen wäre, den biochemischen Vorgang vollständig durchsichtig zu machen.

Die Säuren, die bis jetzt in *Aspergillus*-Kulturen erhalten wurden, sind die Oxal-, Zitronen-, Glukon- und neuerdings auch die Zuckersäure (Walker, Subramanian u. Challenger, Journ. Chem. Soc. London, 1927, S. 200; bedarf jedoch noch der Bestätigung). Da die Theorien der Säurebildung durch pflanzliche Organismen in neueren Arbeiten von Bernhauer und Schoen (Biochem. Zeitschr., Bd. 202, 1928, S. 164) sowie von Wetzel (1927, S. 476) eingehendere Darstellung gefunden haben, sollen sie hier nur in kurzer Zusammenfassung wiedergegeben werden. Grundsätzlich lassen sich die vorhandenen Hypothesen in drei Gruppen einteilen:

1. Die Säuren entstehen als normale oder anomale Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels bezw. der Kohlenhydratveratmung;
2. die Säuren entstehen im Eiweiß-Stoffwechsel als Desaminierungsprodukte; oder
3. sie entstehen als Nebenprodukte der Eiweißsynthese, wobei es nicht ausgeschlossen zu sein braucht, daß ein und dieselbe Säure auf zweierlei Wegen zustande kommen kann.

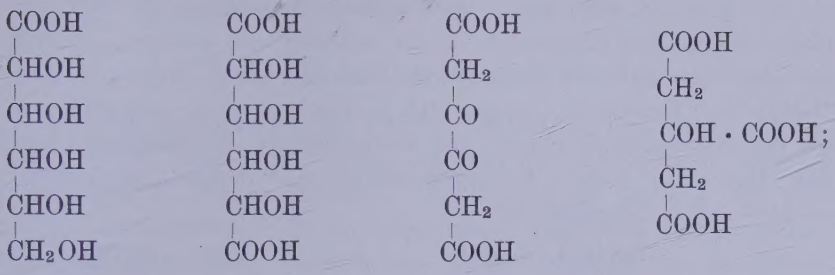
Die Glukonsäure dürfte nach übereinstimmender Ansicht der Autoren ein Produkt des Kohlenhydratstoffwechsels sein, wobei allerdings die Frage vorläufig noch offen bleibt, ob sie ein Intermediär- oder ein Endprodukt desselben ist. Im Gegensatze zu der Glukonsäure läßt sich aber aus den vorliegenden Arbeiten eine Entscheidung darüber noch nicht gewinnen, aus welchem Stoffwechselprozeß die Bildung der Zitronen- und Oxalsäure herzuleiten ist.

Die Zitronensäure wird in wechselnden Mengen, soweit bis jetzt bekannt ist, nur bei der Kultur auf Kohlenstoffquellen mit 3 (Glyzerin, Glyzerinaldehyd, Dioxyazeton), mit 5 (Arabinose, Xylose), mit 6 Kohlenstoffatomen (Glukose, Fruktose, Mannose, Galaktose, Mannit und Glukonsäure) und endlich noch auf Di- und Polysacchariden (Rohrzucker, Maltose, Stärke und Inulin) gefunden. Da nun dies alles Verbindungen mit gerader Kohlenstoffkette sind, die Zitronensäure aber eine solche mit verzweigter ist, so ist die Bildung dieser Säure durch eine einfache Oxydation solcher Kohlenhydrate nicht möglich. Die meisten Hypothesen leiten die Zitronensäure aber trotzdem aus dem Kohlenhydratstoffwechsel her, wie beispielsweise die Parasaccharinsäurehypothese von Knoop und Windaus (Chem. Ztg., Bd. 29, 1905, S. 564) nach dem Schema:

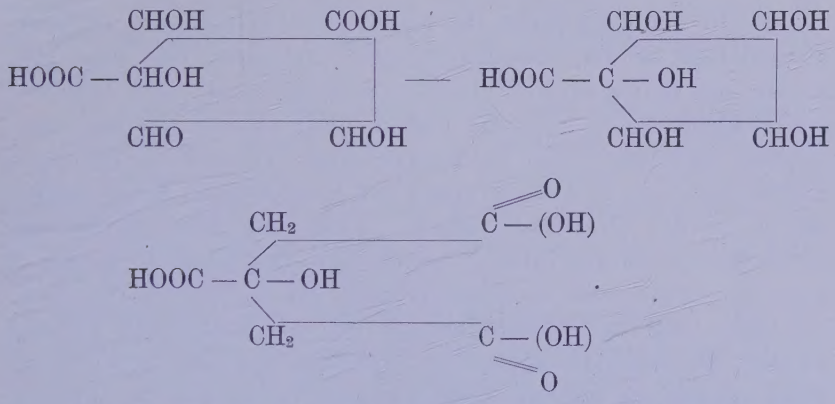
Hexose:		Parasaccharinsäure:		Zitronensäure:
$CH(OH) \cdot CH(OH) \cdot CHO$		$CH(OH) \cdot CH_2(OH)$		CH_2COOH
$CH(OH)$	$\rightarrow$	$C(OH) \cdot COOH$	$\rightarrow$	$C(OH) \cdot COOH$;
$CH(OH) \cdot CH_2OH$		$CH_2 \cdot CH_2(OH)$		CH_2COOH

[die Ableitung der verzweigten Kohlenstoffkette erfolgt also durch die Annahme einer intramolekularen Umstellung, wie sie schon Kiliani (Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 37, 1904, S. 1201) beschrieben hat], oder die Ketipinsäurehypothese von Franzen und Schmidt (Chem. Ber., Bd. 58, 1925, S. 222) nach dem Schema

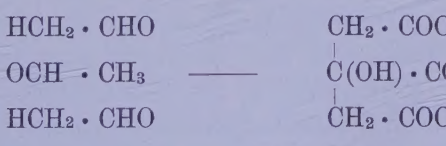
Glukose — Glukonsäure — Zuckersäure und Disproportionierung zu Ketipinsäure-Umlagerung zur Zitronensäure analog der Benzilsäure-Umlagerung:



ferner die Glukuronsäurehypothese von Butkewitsch (Biochem. Zeitschr., Bd. 154, 1924, S. 177) nach dem Schema Glukuronsäure — innere Aldolkondensation — Zitronensäure:

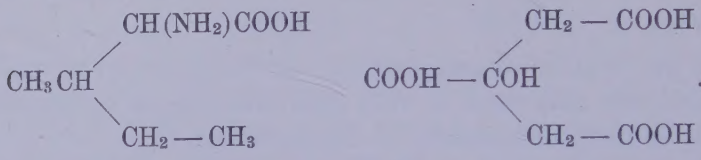


Endlich fehlt es auch nicht an der Annahme, die Zitronensäurebildung in Verbindung mit dem Schema der alkoholischen Gärung zu bringen; in diesem Sinne stellte Euler seine Azetaldehydhypothese (Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, 3. Teil, 1909, S. 182) auf und legte ihr folgendes Schema unter:



Von einer ganz anderen Seite nun wurde die Frage der Zitronensäurebildung angesehen, als Kostytschew auf den Zusammenhang mit dem Desaminierungsprozeß aufmerksam machte und damit die Möglichkeit gewann, die Entstehung dieser Säure

aus dem Eiweißstoffwechsel herzuleiten. Der Vollständigkeit halber sei darauf hingewiesen, daß Mazé und Perrier (Compt. rend., Bd. 139, 1904, S. 311; Ann. Inst. Pasteur, Bd. 18, 1904, S. 533; Bd. 23, 1909, S. 830) schon 1904 ähnliche Vorstellungen vertraten, ohne jedoch den Chemismus näher erklären zu können, so daß ihre Arbeiten nur von historischem Interesse sind. Kostytschew (Lehrb. d. Pflanzenphysiologie, Bd. 1, 1926, S. 413) erinnerte nun an die Bildungsmöglichkeit der Zitronensäure beispielsweise aus dem Isoleucin, dessen Kohlenstoffgerüst mit demjenigen der gesuchten Säure identisch ist:



In die dritte Kategorie der aufgestellten Hypothesen, die diese Säurebildung in den Eiweißstoffwechsel verlegen, fällt noch eine andere von Kostytschew diskutierte Möglichkeit. Die Synthese der Eiweißstoffe in Pflanzen erfolgt nach unserer heutigen Auffassung bekanntlich über Ketosäuren unter Verwandlung von deren Karbonylgruppen in Aminogruppen und Kondensation dieser Aminosäuren zu den Proteïnsubstanzen. Fehlt nun beim Aufbau der Aminosäuren das zur Bildung notwendige Ammoniak, so könnte es nach Kostytschews Annahme (Planta, Bd. 4, 1927, S. 181) möglich sein, daß bei Stickstoffmangel nur die Ketosäuren gebildet werden, die sich dann in stabilere Produkte, wie etwa die Zitronensäure, umwandeln würden. Diese Annahme verlegt also die Zitronensäurebildung in die Eiweißsynthese.

Die Theorien der Oxalsäurebildung bewegen sich in ähnlichen Bahnen wie die der Zitronensäurebildung. Diese Säure wird in *Aspergillus*-Kulturen auf allen möglichen Kohlenstoffquellen erhalten, und die meist vertretene Annahme ihrer Entstehung ist, daß sie als unvollständiges Oxydationsprodukt des dissimilatorischen Stoffwechsels zu betrachten sei. Kostytschew und neuerdings Wetzel (1927, S. 476) waren es, die die Möglichkeit ihrer Bildung aber ebenfalls mit dem Eiweißabbau in Zusammenhang brachten.

Diese hier abgeleiteten Hypothesen durch neue experimentelle Daten zu unterbauen und womöglich in einem oder anderem Sinne in diesen komplizierten Fragen eine sichere Entscheidung herbeizuführen, war somit das weitere Ziel dieser Arbeit.

Abschnitt I.

Methodik.

1. Methodik im mykologischen Teil.

Zu den Kulturversuchen wurden Neutralglas-Erlenmeyerkolben von 500 ccm Inhalt verwendet, die eine durchschnittliche Bodenfläche von 57,5 qcm besaßen. Vor Gebrauch wurden sie mit heißer konzentrierter Chromschwefelsäure behandelt. Nach zehnmaligem Spülen mit destilliertem Wasser wurden sie peinlichst staubfrei getrocknet und mit Wattestopfen versehen (p_H-Watte Hartmann), um darauf an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Heißluftsterilisator je eine Stunde bei 120—125 ° C sterilisiert zu werden. Eine höhere Temperatur wurde ängstlich vermieden, um ein Brüchigwerden der Watte und eine Verunreinigung der Versuchsgefäße durch Fasern zu verhindern.

Als stickstoffreie Nährlösung wurde meist eine Glukoselösung von wechselndem Gehalt mit 0,1 % primärem Kaliumphosphat, 0,02 % Magnesiumsulfat und 0,001 % Eisenchlorid verwendet, der gegebenenfalls dann verschiedene Mengen Kalziumkarbonat zugesetzt wurden. Die karbonatfreie Lösung hatte eine p_H von 4,62, die mit Karbonatzusätzen eine solche von 7,68.

Entsprechend den früheren Experimenten anderer Autoren mit Schimmelpilzen, bei welchen durch Zusatz von Zinksulfat ein erhöhtes Pilzwachstum bezw. Myzelgewicht erreicht wurde, setzte ich ebenfalls einigen meiner Kulturreihen zunächst 0,005 % Zinksulfat zu. Nach 24 Tagen ergab sich aber eine auffallende Differenz einerseits gegenüber den zinkfreien Kulturen und andererseits innerhalb der zinkhaltigen Kulturen zwischen solchen mit und ohne Kalziumkarbonat. In den karbonatfreien Kulturen wurde in der angegebenen Zeit eben noch ein makroskopisch sichtbares Myzel gebildet, während in den karbonathaltigen nichts zu sehen war. Die zinkfreien Kulturen hatten hingegen unter denselben Bedingungen bereits ein unvergleichlich größeres Myzel produziert. Ich setzte diese Untersuchungen insofern noch fort, als ich 12 weitere Kulturen anstellte, denen 0,001 und 0,0001 % Zinksulfat zugegeben wurden; ihre Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Versuchsreihe 1.

Temperatur 30—32 ° C. Kulturdauer 48 Tage.

Versuchs-Nr.	1	2	3
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose,	0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$[1]), zu 100 ccm H_2O	0,001 $FeCl_3$
Zinksulfatzusatz g	—	0,001	0,0001
Myzelgewicht mg	146,802	49,104	72,105
„	147,794	45,724	65,492
„	152,904	41,568	80,422
Mittelwert	**149,266**	**45,465**	**72,673**

Versuchs-Nr.	4	5	6
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose,	0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O	0,001 $FeCl_3$
Zinksulfatzusatz g	—	0,001	0,0001
Myzelgewicht mg	167,004	12,748	40,057
„	162,752	20,234	37,942
„	165,918	15,936	36,942
Mittelwert	**165,224**	**16,306**	**36,313**

1) Gewählt wurde stets das Präparat $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$.

Die gefundenen Werte zeigen deutlich sowohl in saurer als auch in alkalischer Lösung die Giftwirkung des Zinksulfats unter diesen Kulturbedingungen; in den mit Karbonat versetzten Kulturen wird offenbar diese Wirkung durch die Alkalität der Lösung noch verstärkt. Durch den Zusatz von Zinksulfat werden also Bedingungen geschaffen, die eine Luftstickstoffassimilation kaum konstatieren lassen. Übrigens habe ich meine Kulturgefäße nach immer wieder gründlicher Reinigung erneut für Kulturzwecke verwendet, irgendwelchen Einfluß vom Zinkgehalt des Glases, wie Lappalainen (Akad. Abhandlg. Helsingfors, 1919) angibt, aber nie bemerken können.

Um eine absolut gleichmäßige Zusammensetzung der Nährlösungen für ein und dieselbe Kulturreihe zu bekommen, wurden die entsprechenden Lösungsmengen gleichzeitig angefertigt und davon je 100 ccm in die einzelnen Versuchsgefäße pipettiert, in die gegebenenfalls ein Kalziumkarbonatzusatz schon vorher analytisch eingewogen worden war. Die Lösungen wurden nun an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 15 Minuten lang im Dampftopf sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde der Wattebauschverschluß durch einen doppelt durchbohrten Gummistopfen ersetzt, in dessen Bohrungen sich zwei rechtwinklig gebogene Glasröhren befanden.

Der Schenkel der einen Röhre reichte soweit zum Boden des Erlenmeyerkolbens, daß er unter den Spiegel der Nährlösung kam, während ein Schenkel der anderen Röhre nur wenig über den Gummistopfen hinaus in das Lumen des Gefäßes reichte. Die außerhalb des Erlenmeyerkolbens befindlichen Schenkel der beiden Röhren waren kugelig aufgeblasen, um ein Wattefilter aufnehmen zu können. Vor Gebrauch wurden diese Röhren ebenfalls mit Chromschwefelsäure behandelt, gewaschen, staubfrei getrocknet und im Heißluftsterilisator sterilisiert, nachdem ihre Kugeln und vorläufig auch die Röhrenenden mit Wattefiltern versehen worden waren. Die Gummistopfen unterlagen einer mehrtägigen Vorbehandlung mit Kalilauge, wurden dann gewaschen und kurz vor Gebrauch auch noch mit Alkohol keimfrei gemacht. Nach einer nochmaligen Sterilisation von 10 Minuten im strömenden Dampfe waren die Kulturen impfbereit.

Um einigermaßen gleiche Sporenzahlen pro Kultur zu erreichen, wurde jede Kultur mit $^1/_2$ ccm einer Sporenaufschwemmung versetzt. Diese Sporenaufschwemmung wurde soweit verdünnt und mikroskopisch kontrolliert, daß ca. 1500—2000 Sporen in diesem $^1/_2$ ccm enthalten waren. Um dem Einwand zu begegnen, daß mit der Sporenaufschwemmung in die Nährlösung gebundener Stickstoff gebracht werde, der allenfalls als Stickstoffquelle für das Myzelwachstum in Frage kommt, wurde der Stickstoffgehalt der Sporen untersucht. Dabei zeigte sich, daß der Stickstoffgehalt einer Aufschwemmung von 100000 Sporen überhaupt noch nicht, der einer Emulsion von 200000 eben vielleicht gerade noch mit Neßlerschem Reagens wahrnehmbar ist. Daraus erhellt, daß die Sporenaufschwemmung in ihrem Stickstoffgehalt völlig vernachlässigt werden kann.

Jeweils sechs solche geimpfte Kulturgefäße wurden nun mit ebenfalls in Lauge vorbehandelten und in Alkohol sterilisierten, möglichst kurzen Gummischläuchen verbunden, und an diese Kolonne außerdem an beiden Enden ungeimpfte Kulturgefäße mit der gleichen Nährlösung zur Kontrolle angehängt. Durch diese Kulturreihen wurde täglich mittels einer Wasserstrahlpumpe $^1/_2$ Std. lang Luft gesaugt, die in Vorlagen gereinigt wurde. Solche Vorlagen bestanden aus zwei mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllten Waschflaschen, denen zwei mit Bimssteinstückchen gefüllte U-Röhren folgten, die mit konzentrierter Schwefelsäure getränkt waren; an diese schlossen sich noch eine mit steriler Watte ge-

füllte U-Röhre und endlich noch eine Waschflasche mit sterilem Wasser an. Letztere bezweckte eine zu starke Verdunstung der Nährlösungen zu verhindern, und in der Tat betrug dieser Verlust nach 48 Tagen auch nie mehr als etwa 8 ccm pro Kulturlösung.

Anfangs war in die Vorlage auch noch eine Waschflasche mit Lauge geschaltet worden, die jedoch infolge ihrer CO_2-Absorption das Myzelwachstum offensichtlich beeinträchtigte. In kalziumkarbonathaltigen Kulturen machte sich dies auffallend darin bemerkbar, daß die mit zunehmender Entfernung von der Lauge befindlichen Kulturen in der ersten Versuchszeit zunehmende Größe der Myzelgewichte zeigten. Läßt man die Waschflasche mit der Lauge jedoch weg, so zeigen sich keine Differenzen. Weniger ausgeprägt zeigte sich dies auch bei karbonatfreien Kulturen, sofern sie nicht im Thermostaten standen. Daraus geht hervor, wie auch später Rippel und Bortels (Biochem. Zeitschr., Bd. 184, 1927, S. 237) fanden, daß die Kohlensäure auch für die Heterotrophen irgendeine wichtige Bedeutung hat. Die gefundenen Differenzen zwischen karbonatfreien und karbonathaltigen Kulturen sind wohl so zu deuten, daß infolge der Säuerung in karbonathaltigen Kulturen außer der Atmungskohlensäure noch solche aus dem Kalziumkarbonat frei wird. In den Kulturen bei höheren Temperaturen ist die Menge der Atmungskohlensäure erheblich größer, weshalb keine Unterschiede auftreten; und aus demselben Grunde wird in älteren Kulturen ein Ausgleich eintreten.

Die Analysen der Kontrollkulturen ergaben, daß diese Sicherungen gegen die Absorption von gebundenem Stickstoff aus der Luft vollkommen ausreichten, und daß selbst bei 12wöchentlicher täglicher Durchlüftung derselben in der angegebenen Weise keinerlei Stickstoffaufnahme zu finden war. Auch in dem Wasser der Vorlagen konnten niemals, weder mit Neßlerschem Reagens noch mit Diphenylaminschwefelsäure oder Lunges Reagens auf Nitrite, die geringsten Spuren von Stickstoff nachgewiesen werden.

Die Pilzstämme, die für die Untersuchungen dienten, waren folgende: Der als *Aspergillus niger* Tübingen bezeichnete Stamm wurde im Jahre 1926 gelegentlich des oben erwähnten mykologischen Kurses isoliert und am meisten für die folgenden Untersuchungen verwendet. Zum Vergleich wurden noch einige andere Pilzrassen herangezogen und zwar die drei von E. Schiemann 1912 isolierten Mutanten *Aspergillus niger cinnamomeus montanus*,

Aspergillus niger fuscus montanus und *Aspergillus niger* var. *altipes* (bezogen von der Zentrale für Pilzkulturen, Baarn). Außerdem erhielten wir zwei Pilzstämme von Prof. Wehmer in Hannover, den *Aspergillus niger ficuus* und den *Aspergillus niger* Göttingen; endlich wurde noch der *Citromyces* P_{23} aus Weihenstephan zu einigen Untersuchungen verwendet.

2. Methodik im chemisch-analytischen Teil der Arbeit.

a) Stickstoffbestimmungen.

Für die vorliegenden Untersuchungen war es besonders wichtig, hinreichend empfindliche Stickstoffbestimmungsmethoden auszuwählen. Als besonders geeignet für die hier auszuführenden Serienbestimmungen erwies sich die von Parnas und Wagner (Biochem. Zeitschr., Bd. 125, 1921, S. 253) modifizierte Mikrokjeldahlmethode, deren ausführliche Würdigung bei Pregl (Quantitative Mikroanalyse, 2. Aufl., 1923, S. 116) zu finden ist. Das Kühlrohr meines Apparates bestand nach Bangs Vorschlag aus Silber. Die Titration wurde mit n/100 Lösung unter Verwendung von Methylrot als Indikator ausgeführt. War der Stickstoffgehalt der zu analysierenden Substanz oder Lösung geringer als 0,14 mg (entsprechend 1 ccm n/100 Salzsäure), so wurde der Stickstoff kolorimetrisch bestimmt. Dazu wurde die Analysensubstanz zunächst verbrannt, und das Ammoniak im Apparat von Parnas und Wagner überdestilliert. Das klare Filtrat wurde im Wollfschen Kolorimeter neßlerisiert. Von dem nach Folin und Wu (Journ. of biol. chem., 38, 1919, S. 87) hergestellten Neßlerschen Reagens wurden 0,5 ccm den 8—10 ccm Destillat auf einmal zugefügt und nach 10 Minuten kolorimetrisch verglichen. Die Vergleichslösung enthielt 0,002 mg Stickstoff pro Kubikzentimeter und war mit Spuren Toluol konserviert. Wenn also, um ein Beispiel zu nennen, das Destillat aus 15 ccm Nährlösung mit 5 ccm Standardlösung Farbengleichheit zeigte, so enthielt die Nährlösung in 150 ccm 0,1 mg Stickstoff.

Bei den Kjeldahlstickstoffbestimmungen der Myzelien wurden im allgemeinen 20—40 mg derselben eingewogen und in Verbrennungsröhrchen mit 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von etwas Kalium- und Kupfersulfat verbrannt. Bei den Kjeldahlbestimmungen der Nährlösungen wurden 15 ccm zuerst etwas eingedampft und dann je nach der vorhandenen Zuckermenge mit 1—5 ccm konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz

obigen Salzgemisches in gleicher Weise behandelt. Um die Verbrennung zu beschleunigen, wurde sie nach einiger Zeit unterbrochen, und 5—6 Tropfen 30% Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt. Die Umrechnung der gefundenen Werte auf das Gesamtmyzel bezw. die Gesamtnährlösung zeigte dann die Stickstoffwerte für die ganze Kultur an.

Die Stickstoffbestimmungen mußten selbstverständlich in absolut ammoniakfreiem Raume ausgeführt werden, der deshalb dauernd gelüftet wurde und aus dem jegliche Ammoniakflaschen entfernt worden waren. Ferner zeigte sich, daß auch ein besonderes Augenmerk auf die Reinheit des Destillationsapparates zu richten war, der mindestens eine Stunde vor Gebrauch vom Dampfe durchströmt werden mußte. Um brauchbare Resultate zu erhalten, mußte auch allergrößte Sorgfalt auf reine Reagentien gelegt werden, oder zum mindesten mußte ein event. Stickstoffgehalt derselben bekannt sein und dann immer wieder bestimmt werden. Absolut reine Schwefelsäure zu bekommen, war nur einmal möglich; die übrigen Lieferungen enthielten stets noch nachweisbare Mengen N, selbst wenn sie als vollständig stickstoffrei geliefert waren. Die Glukose (Saccharum amylaceum purissimum Merck) war ebenfalls mit geringen Spuren Stickstoff, die zu 0,08 mg pro 100 g bestimmt wurden, versehen; diese Menge konnte jedoch vernachlässigt werden. Absolut stickstoffrei waren die übrigen Reagentien: Salzsäure (Kahlbaum), Natronlauge (Kahlbaum), 30% Wasserstoffsuperoxyd, primäres Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Kupfer- und Kaliumsulfat (Merck). Die Säuren wurden unter Glasglocken aufbewahrt, die mit konzentrierter Schwefelsäure abgeschlossen waren. Die von Schleicher & Schüll bezogenen Filtrierpapierscheiben waren ebenfalls noch stickstoffhaltig, sie enthielten für 9 cm Durchmesser 0,02 mg Stickstoff.

b) Säurebestimmungen.

Für die Bestimmung der Zitronen- und Oxalsäure bediente ich mich hauptsächlich der Methode von Butkewitsch (Biochem. Zeitschr., Bd. 131, 1922, S. 327) neben der von Amelung (Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 166, 1927, S. 206), die bei Gegenwart großer Mengen Oxalsäure und geringer Mengen Zitronensäure bessere Werte ergibt als die erstere. Die Glukonsäurebestimmungen wurden durch zweimalige Fällung des Kalziumsalzes mit Alkohol ausgeführt. Den Säureberechnungen wurden stets die wasserfreien

Verbindungen zugrundegelegt. Das Kalziumglukonat wurde bei 95°, das Kalziumoxalat bei 105—110° und das Kalziumzitrat bei 130—135° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Identifizierung der Zitronensäure dienten die Denigèssche Reaktion und die quantitative Ca-Bestimmung des Kalziumsalzes.

Es seien hier einige Werte als Beweis für die Reinheit der aus den Kulturen erhaltenen Zitratniederschläge angeführt:

$Ca_3(C_6H_5O_7)_2$ Ca = 24,13 %.

Einwage	CaO	Ca %
0,1749	0,0585	23,90
0,1284	0,0434	24,16
0,1590	0,0539	24,23
0,2007	0,0682	24,28
0,1133	0,0390	24,60

Zur Identifizierung der Glukonsäure wurde das Phenylhydrazid nach Fischer (Chem. Ber., Bd. 22, 1889, S. 2718) und das Cinchoninsalz ebenfalls nach Fischer (Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 23, 1890, S. 803) dargestellt. Der Schmelzpunkt des ersteren lag bei 198,5° C (nach Fischer bei 195—200°), dann trat rasche Zersetzung ein; der Schmelzpunkt des Cinchoninsalzes lag bei 188° C (nach Fischer bei 187°). Einige Kalziumbestimmungen von gefälltem Kalziumglukonat ergaben folgende Werte:

$Ca(C_6H_{11}O_7)_2 \cdot H_2O$ Ca = 8,94 %.

Einwage	CaO	Ca %
0,2702	0,0352	9,31
0,2574	0,0327	9,08
0,1942	0,0248	9,12

c) Aufarbeitung der Kulturen.

Die Aufarbeitung der Kulturen mußte nach zwei verschiedenen Weisen erfolgen, je nachdem, ob Kalziumkarbonat den Nährlösungen vorher zugesetzt worden war oder nicht. Zunächst wurde der Kulturflüssigkeit mit einer Pipette 5 ccm entnommen und in eine Elektrode des Luerschen Elektrojonometers gefüllt, um die $H^{\cdot}$-Konzentration zu messen. Nach dieser Messung wurde die

Flüssigkeit wieder vorsichtig aus dem Elektrodengefäß in die Kulturlösung zurückgespült, und danach durch Filtration Myzel- und Kulturflüssigkeit getrennt. War kein Kalziumkarbonat der Nährlösung zugesetzt, so wurde das Myzel mit warmem Wasser nachgespült, und das Filtrat auf 150 ccm aufgefüllt. Je 15 ccm dieses Filtrates dienten zur Bestimmung der Gesamtazidität durch Titration mit n/10 Alkali unter Verwendung einer D. A. B.-Mikrobürette und zur Stickstoffbestimmung in der oben angegebenen Weise. Mit weiteren je 5 ccm wurde der Zucker nach Bertrand bestimmt und auf das Vorhandensein von Zitronensäure mit Denigèsschem Reagens geprüft. In 100 ccm endlich wurden dann die Säuren quantitativ bestimmt, indem die Lösung mit Kalziumkarbonat im Überschuß versetzt und auf dem Wasserbade zunächst auf die Hälfte eingedampft wurde. In dem davon heiß abfiltrierten und heiß ausgewaschenen Bodensatz wurde die Bestimmung und event. Trennung des Kalziumoxalats und Kalziumzitrats durchgeführt, während das Filtrat im Vakuum weiter eingeengt und daraus das Kalziumglukonat dann mit Alkohol gefällt wurde. — Das Myzel wurde bei 100° getrocknet, gewogen und sein Stickstoffgehalt bestimmt.

War der Nährlösung von vornherein Kalziumkarbonat zugesetzt worden, so schieden sich zwischen den Hyphen des Myzels Kristalle der ausgefallenen Kalksalze ab, insbesondere Oxalatkristalle. Diese mußten mit verdünnter Salzsäure herausgelöst, und darin die Säuren für sich bestimmt werden, weil die quantitative Glukonatbestimmung durch Kalziumchlorid beeinträchtigt, ja ganz verhindert werden kann. Anschließend seien einige Werte angeführt, die bei bestimmt eingewogenen Glukonatmengen und verschiedenen Kalziumchloridzusätzen in 25 ccm Wasser durch Fällung mit dem vierfachen Volumen 96% Alkohols erhalten wurden.

Eingewogene Menge	$CaCl_2$-Zusatz	Durch Fällung wiedererhaltenes Glukonat	Fehler in %
0,5	0	0,4972	0,56
1,0	0	0,9971	0,29
0,5	0,1	0,4952	0,96
1,0	0,1	0,9974	0,26
0,5	0,5	0,4792	5,42
1,0	0,5	0,9691	3,09
0,5	1,0	Trübung	100,0
1,0	1,0	0,8915	8,49
0,5	2,0	Trübung	100,0
1,0	2,0	keine Fällung	100,0

Zu gleichen Ergebnissen kommt beim System Bariumbromid-Bariumglukonat neuerdings auch Kiliani (Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1929, Märzheft).

Aus diesen Gründen erfolgte die Aufarbeitung der Kulturen so, daß — wie im ersten Falle — das Myzel zunächst nur mit Wasser nachgespült wurde, und dann der salzsaure Extrakt des Myzels erst nach der Trennung der Glukonsäure entweder dem übrigen Rest des Oxalats bezw. Zitrats hinzugefügt, oder meist darin die Säuren für sich selbst bestimmt wurden. Man könnte vermuten, daß durch dieses Auswaschen des Myzels mit Salzsäure die Stickstoffbestimmung des Myzels beeinträchtigt würde; denn es wäre denkbar, daß Stickstoffsubstanzen mit extrahiert werden. Kolorimetrische Stickstoffbestimmungen in solchen salzsauren Auszügen ergaben selbst bei Myzelmengen bis zu 180 mg, die den höchsten Erntemengen entsprachen, keine höheren Werte als 0,1 mg, ein Verlust, der also praktisch vernachlässigt werden konnte.

Abschnitt II.

Experimenteller Teil.

1. Luftstickstoffassimilation.

a) Allgemeiner Beweis für die Assimilierbarkeit des Luftstickstoffs durch *Aspergillus niger*.

Allein die Fortschritte auf dem Gebiete der mikroanalytischen quantitativen Bestimmungsmethoden ließen es sinnvoll erscheinen, die strittige Frage der Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch Pilze neu anzugreifen. Eine kritische Betrachtung der bisher in allen Arbeiten verwendeten Makrokjeldahlmethode zeigt, daß sie für mykologische Untersuchungen dieser Art nicht in Frage kommen kann. Es ist unmöglich, mit ihr richtige Resultate zu erhalten, wenn die zur Verfügung stehenden Analysensubstanzen und die darin enthaltenen Stickstoffmengen so gering sind, daß die Differenz zwischen der Anzahl ccm vorgelegter Säure und zurücktitrierter Lauge nur wenig mehr oder gar noch weniger als 1 ccm n/10 Lösung beträgt. Der Ablesefehler der Makrobüretten, die geringe Empfindlichkeit der Makrowage, der auf einen Tropfen nicht scharf erfolgende Umschlag von Methylorange und endlich der Verbrauch großer Mengen Schwefelsäure, die sehr leicht ammoniakhaltig werden, sind Fehlerquellen, die eine sichere Ent-

scheidung der zur Diskussion stehenden Probleme nicht zulassen. Außer ihrer größeren Genauigkeit hat die Mikrokjeldahlmethode auch noch den Vorteil, daß sie bei dem geringen Bedarf an Analysenmaterial auch noch andere Bestimmungen, wie etwa die quantitative Untersuchung des Säurestoffwechsels, zuläßt. Wie diese Arbeit weiterhin zeigen wird, stehen wir durch die Übernahme der mikroanalytischen Methoden in diesem Teil der physiologischen Mykologie geradezu vor einem neuen Arbeitsgebiet, und es dürfte sich fast erübrigen, auf die älteren Arbeiten noch genauer einzugehen.

Die schon in der Einleitung erwähnten Versuche, die Assimilierbarkeit des Luftstickstoffs zu beweisen, wurden zunächst mit dem *Aspergillus niger* Tübingen auf flüssigen stickstoffreien Nährböden weitergeführt, indem anfänglich je dreimal sechs hintereinander geschaltete Kulturen bei 20—22° sowie bei 30—32° C in der angegebenen Weise aufgestellt wurden.

Das Wachstum des Pilzes vollzieht sich unter diesen anomalen Bedingungen folgendermaßen: Wenige Tage nach der Impfung der Kulturen zeigt sich die Keimung der Sporen mit einer deutlichen Trübung der vorher völlig klaren Nährlösung an. Das Auftreten des ersten Myzels läßt sich dann meist schon im Laufe der ersten Woche feststellen. Während der weiteren Kulturdauer (in maximo bis zu 48 Tagen) bildet sich eine deutliche Pilzdecke, die freilich nicht immer ganz geschlossen ist, sich aber relativ stark am Rande des Kulturgefäßes und um das Luftzuführungsrohr herum entwickelt; außerdem wird nach und nach die ganze Nährlösung mehr oder minder stark von Pilzhyphen durchzogen. An der Oberfläche des Myzels sporuliert der Pilz sehr bald und bildet normale, charakteristisch schwarzbraun gefärbte Konidien. Der mikroskopische Befund der Pilzdecke zeigt ein ausgesprochenes Hungermyzel, d. h. dünne, mit nur geringem protoplasmatischem Inhalt versehene Hyphen. Ebenso sind die Konidienträger dünn und schwach und tragen relativ wenige Konidien. Besondere Anomalien waren sonst nicht festzustellen. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß es sich hier zwar um einen schlecht ernährten und kümmerlich wachsenden, in seinen Lebensfunktionen aber keineswegs besonders beeinträchtigten Pilz handelt. Dieser Zustand der Kulturen war bei allen folgenden Untersuchungen im wesentlichen der gleiche bis auf geringe durch die jeweiligen Bedingungen bezw. die verwendete Rasse gegebene Differenzen.

Man konnte deshalb im folgenden von einer weiteren eingehenderen Schilderung des morphologischen Habitus einzelner Kulturen absehen. Die Kulturen wurden nun nach 8, 16, 24, 32, 40 und 48 Tagen einer Analyse unterzogen; zunächst wurden jedesmal je drei Kulturen analysiert, um anfänglich einen Überblick über die Variationsbreite der einzelnen Kulturen zu bekommen bezw. brauchbare Mittelwerte zu erhalten. Die Resultate dieser ersten Analysen zeigten jedoch, daß die Konstanz der Bedingungen so eingehalten werden konnte, daß die einzelnen Versuche nur relativ geringe Abweichungen von den Mittelwerten zeigten[1]). Dies veranlaßte mich bei späteren Versuchen, bei denen durch die Säurebestimmungen die Zahl der Analysen noch erheblich gestiegen war, stets nur noch eine Kultur zu analysieren.

Die Resultate der ersten Versuchsreihen sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt, sie ergaben zunächst mit Sicherheit, daß der *Aspergillus niger* Tübingen atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren vermag. Die erreichten Höchstmengen betrugen unter diesen Bedingungen in der Versuchsreihe 2 2,97 mg (Versuch Nr. 19), im Mittel 2,69 mg nach 40tägiger Kulturdauer und in der Versuchsreihe 3 4,01 mg Stickstoff (Versuch Nr. 40), im Mittel 3,9 mg nach 48 Tagen. Die Myzelien enthielten durchschnittlich wenig mehr als 1 % Stickstoff, bezogen auf ihr Trockengewicht, während die größere Stickstoffmenge sich in der Nährlösung befand. Vergleicht man mit diesen Stickstoffsätzen den Stickstoffgehalt normal erzogener Myzelien, so findet man diesen für den *Aspergillus niger* Tübingen beispielsweise bei Ernährung mit 10 % Glukoselösung, den einleitend erwähnten Mineralsalzen und 150 mg Stickstoff als Ammoniumzitrat nach 3 Tagen bei 30° C zu 6,56 %. Diese außerordentliche Differenz, die sich bei der gleichen Rasse in dem Stickstoffgehalt des Myzels unter den verschiedenen Bedingungen zeigt, gibt zugleich eine Erklärung dafür, wie es möglich ist, daß bei so verhältnismäßig geringen Stickstoffmengen, wie sie sich bei der Analyse in den vorher stickstoffrei

1) Da der Beweis dafür, wie weit die Konstanz der analytischen Werte in einer Kultur bei Verwendung gleichartiger Stämme getrieben werden kann, für die allgemeine mykologische Methodik bedeutungsvoll ist, wurden die Tabellen 2—5 in aller Ausführlichkeit (Einzelwerte und Mittelwerte) publiziert, was in den späteren wegfällt. Doch sind auch in allen anderen Tabellen ausreichende analytische Daten aufgeführt, so daß die Resultate jederzeit nachgeprüft werden und außerdem die Basis für weitere Versuche darstellen können.

Tabelle 2. Versuchsreihe 2.

Kulturdauer Tage	8				16				24			
Zusammensetzung der Nährlösung	5 g Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$,											
Versuch Nr. . .	7	8	9	Mittel	10	11	12	Mittel	13	14	15	Mittel
Azidität . . ccm	19,82	21,50	20,38	**20,56**	94,12	87,33	99,25	**96,90**	165,7	172,3	175,9	**171,3**
p_H	2,81	2,93	2,79	**2,85**	2,65	2,59	2,48	**2,57**	1,92	1,87	1,85	**1,88**
Myzelgewicht mg	11,46	11,87	14,71	**12,68**	28,20	30,73	35,31	**31,41**	39,54	43,82	43,00	**42,12**
Stickstoffgehalt des Myzels mg	0,12	0,14	0,16	**0,14**	0,41	0,43	0,38	**0,41**	0,48	0,63	0,60	**0,57**
Stickstoffgehalt des Myzels in %	1,09	1,21	1,10	**1,13**	1,44	1,40	1,06	**1,30**	1,22	1,43	1,39	**1,34**
Stickstoffgehalt d. Nährlösung mg	0,57	0,54	0,62	**0,58**	0,82	0,84	0,93	**0,86**	1,47	1,41	1,52	**1,47**
Gesamtstickstoff-assimilation mg	0,69	0,69	0,78	**0,72**	1,22	1,26	1,31	**1,26**	1,95	2,04	2,12	**2,03**
Glukose . . . g	4,45	4,38	4,48	**4,42**	3,38	3,42	3,23	**3,34**	3,12	3,01	3,08	**3,07**
Glukose-verbrauch . g	0,55	0,62	0,52	**0,58**	1,62	1,58	1,77	**1,69**	1,88	1,99	1,92	**1,93**

Tabelle 3. Versuchsreihe 3.

Kulturdauer Tage	8				16				24			
Zusammensetzung der Nährlösung	5 g Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$,											
Versuch Nr. . .	25	26	27	Mittel	28	29	30	Mittel	31	32	33	Mittel
Azidität . . ccm	39,08	42,27	42,34	**41,20**	100,2	87,68	83,48	**90,45**	162,4	160,9	149,9	**157,7**
p_H	3,19	3,41	3,24	**3,29**	2,93	2,88	2,71	**2,84**	2,40	2,10	2,05	**2,18**
Myzelgewicht mg	18,37	20,46	22,99	**20,61**	37,31	31,72	36,00	**35,01**	70,60	77,31	68,43	**72,11**
Stickstoffgehalt des Myzels mg	0,25	0,22	0,30	**0,26**	0,58	0,41	0,36	**0,45**	0,84	1,04	0,83	**0,90**
Stickstoffgehalt des Myzels in %	1,38	1,07	1,31	**1,25**	1,55	1,22	0,99	**1,27**	1,19	1,35	1,22	**1,25**
Stickstoffgehalt d. Nährlösung mg	0,54	0,61	0,69	**0,61**	1,12	1,19	1,24	**1,18**	2,16	2,27	2,35	**2,26**
Gesamtstickstoff-assimilation mg	0,79	0,83	0,99	**0,87**	1,70	1,60	1,60	**1,63**	3,00	3,31	3,19	**3,17**
Glukose . . . g	4,23	4,25	4,21	**4,23**	3,22	3,39	3,37	**3,33**	1,97	1,75	2,02	**1,91**
Glukose-verbrauch . g	0,77	0,75	0,79	**0,77**	1,78	1,61	1,63	**1,67**	3,03	3,25	2,98	**3,09**

Temperatur: 20—22° C.

32				40				48			
0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O											
16	17	18	Mittel	19	20	21	Mittel	22	23	24	Mittel
228,5	221,0	231,1	**226,9**	245,2	240,4	245,4	**243,7**	248,7	237,2	241,7	**243,3**
1,61	1,55	1,48	**1,55**	1,53	1,50	1,56	**1,53**	1,49	1,60	1,47	**1,52**
65,41	57,79	59,58	**60,93**	70,77	66,49	67,34	**68,16**	67,59	75,24	74,89	**72,57**
0,67	0,81	0,67	**0,72**	0,70	0,78	0,71	**0,73**	0,74	0,78	0,69	**0,74**
1,02	1,40	1,12	**1,14**	0,99	1,17	1,04	**1,06**	1,10	1,03	0,92	**1,01**
1,88	1,73	1,81	**1,81**	2,27	1,80	1,79	**1,59**	1,99	1,70	1,72	**1,80**
2,55	2,54	2,49	**2,52**	2,97	2,57	2,53	**2,69**	2,77	2,48	2,41	**2,55**
2,81	2,78	2,77	**2,79**	2,43	2,63	2,50	**2,52**	2,61	2,38	2,38	**2,46**
2,19	2,22	2,23	**2,21**	2,57	2,37	2,50	**2,48**	2,39	2,62	2,62	**2,54**

Temperatur: 30—32° C.

32				40				48			
0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O											
34	35	36	Mittel	37	38	39	Mittel	40	41	42	Mittel
161,4	170,9	178,3	**170,2**	184,5	175,2	176,9	**178,8**	161,2	171,3	167,1	**166,5**
2.09	2,14	2,24	**2,15**	1,79	1,96	1,88	**1,87**	1,99	1,85	2,01	**1,95**
110,02	108,37	99,72	**106,04**	130,05	128,74	124,61	**127,49**	145,35	139,54	136,70	**140,53**
1,54	1,14	1,02	**1,23**	1,25	1,17	1,23	**1,22**	1,29	1,39	1,4	**1,36**
1,39	1,05	1,02	**1,15**	0,96	0,91	0,99	**0,95**	0,89	0,99	1,02	**0,96**
2,34	2,55	2,69	**2,52**	2,64	2,75	2,41	**2,60**	2,71	2,41	2,51	**2,54**
3,88	3,68	3,71	**3,76**	3,89	3,92	3,64	**3,82**	4,01	3,80	3,91	**3,90**
1,50	1,59	1,28	**1,46**	0,99	1,12	1,02	**1,04**	1,02	0,89	0,84	**0,91**
3,50	3,41	3,72	**3,54**	4,01	3,88	3,98	**3,96**	3,98	4,11	4,16	**4,08**

angesetzten Kulturen fanden, doch ein an Gewicht und Umfang immerhin stattliches Myzel zustande kommt. Offenbar geht die energetische Leistung, die der Pilz zur Reduktion des molekularen Stickstoffs aufwenden muß, bis an die äußerste Grenze seiner Leistungsfähigkeit, so daß er mit dem einmal assimilierten Stickstoff so sparsam umgeht, daß gerade eben Lebens- und Vermehrungsfähigkeit garantiert sind.

b) Bedingungen der Luftstickstoffassimilation.

1) Energiequellen.

Nach der anfänglichen sicheren Konstatierung des Faktums der Assimilation elementaren Stickstoffes rückte nun zunächst für die weitere Untersuchung das Problem nach den Bedingungen, unter denen dieser Prozeß abläuft, in den Vordergrund. Die erste Frage, die es in diesem Sinne zu beantworten galt, war die nach der Energiequelle für die Stickstoffbindung. Bei pflanzlichen Organismen sind es normalerweise die Oxydationen der Kohlenhydrate, die als wesentlichste Energiequellen für die vitalen Abläufe in Betracht kommen, und in der Tat zeigen die Kulturen des *Aspergillus niger* Tübingen unter den Kulturbedingungen ohne gebundenen Stickstoff eine außerordentliche Erhöhung des Kohlenhydratverbrauches. Dies geht sehr deutlich aus einem Vergleiche der Ergebnisse in Tabelle 2 und 3 mit denjenigen z. B. in Tabelle 22 hervor. Dort wurde der *Aspergillus niger* zwar auch noch unter relativ stickstoffarmen Bedingungen in der üblichen Nährlösung mit 10 % Glukose und 30 mg Stickstoff kultiviert. Doch ist der Glukoseverbrauch bezogen auf die Myzelgewichte schon ein erheblich geringerer. In der Versuchsreihe 2 entsprechen 72,5 mg Myzel (Versuch Nr. 22—24) einem Glukoseverbrauch von 2,54 g, in Tabelle 3 (Versuch Nr. 40—42) 140,5 mg einem solchen von 4,08 g, während in der mit gebundenem Stickstoff versetzten Kultur 1,103 g Myzel (Tabelle 22, Versuch Nr. 196) einem Glukoseverbrauch von 4,5 g entsprechen; das ist bezogen auf die Myzelgewichte im ersten Falle das Neunfache, im zweiten das Siebenfache von dem Kohlenhydratverbrauch in der 8tägigen mit 30 mg gebundenem Stickstoff versetzten Kultur.

Diese anfänglichen Versuche ließen vermuten, daß der Pilz eine Luftstickstoffassimilation nur dann durchführen kann, wenn ihm eine besonders leicht oxydierbare Kohlenstoffquelle zur Ver-

fügung steht. Will man also die Beziehung verschiedener Kohlenstoffquellen dazu untersuchen, so steht schon aus diesem Grunde nur eine relativ beschränkte Anzahl zur Verfügung. Abgesehen davon ergibt sich aber auch noch eine methodische Schwierigkeit; denn es können nur solche Substanzen verwendet werden, die technisch so weit stickstoffrei darstellbar sind, daß sie keine Fehlerquellen für den Versuch ergeben. Diesen Bedingungen entsprach tatsächlich außer der Glukose nur noch Fruktose (Kahlbaum), während Mannit, Rohrzucker und Maltose als zu stickstoffhaltig ausschieden.

Ein mit Fruktose als Kohlenstoffquelle angestellter Versuch verlief aber ergebnislos. Die Sporen des Pilzes keimten zwar, was sich an der Trübung der Lösung erkennen ließ, doch kam ein weiteres Wachstum nicht zustande. Dieses an sich zunächst seltsame negative Ergebnis fand erst später seine Aufklärung, als das Problem der Säurebildung in stickstoffreien Kulturen näher untersucht worden war. Es wird sich im zweiten Teil der Arbeit zeigen lassen, daß die Oxydation der Glukose zu Glukonsäure in unmittelbarem Zusammenhang mit der Stickstoffassimilation steht. Da aber die Oxydation einer Ketose, wie die Fruktose, erheblich schwieriger ist als die einer Aldose, so dürfte darin die Erklärung für den negativen Verlauf des Versuches gegeben sein.

2) Einfluß der Säureproduktion auf die Luftstickstoffassimilation.

Als ein weiteres wesentliches Moment bei der Assimilation atmosphärischen Stickstoffes erwiesen sich schon in den ersten Versuchen die vom *Aspergillus niger* Tübingen produzierten organischen Säuren, woraus sich ihre eingehendere Untersuchung als nötig erwies.

Bezieht man die gebildeten Säuremengen genau so wie vorher den Glukoseverbrauch nun auch auf die produzierten Myzelien, so zeigt sich, daß die Säureproduktion bezw. die Säureanhäufung außerordentlich groß ist; doch ergeben sich analog dem Glukoseverbrauch in den beiden Versuchsreihen auch hier erhebliche Differenzen. So wird z. B. in den Kulturen bei 20—22 ° C schon nach 24 Tagen eine Gesamtazidität erreicht, wie sie in der Versuchsreihe 3 während der ganzen Kulturdauer kaum viel höher zustande kommt. Im ersten Falle entspricht dieselbe 171 ccm n/10 Alkali, im zweiten dagegen nur 157,7 ccm. Nach Verlauf der

ganzen Versuchsdauer beträgt aber die titrimetrische Azidität in der Versuchsreihe 2 außerdem noch 80 ccm mehr als bei den Versuchen bei 30—32 ° C. Ebenso verhält es sich mit der aktuellen Azidität, die in Tabelle 2 nach 24 Tagen im Mittel 1,88, nach 48 Tagen 1,52 und in Versuchsreihe 3 nach denselben Zeiten nur 2,18 bezw. 1,95 p_H beträgt. Diese starke Säureproduktion ist mit dem gesteigerten Energiebedarf in Zusammenhang zu bringen, wie er durch die Oxydation der Glukose zu Glukonsäure zum Ausdruck kommt. Dadurch werden schon in wenigen Tagen durch den Pilz Lebensbedingungen geschaffen, die auf sein eigenes Myzelwachstum schädlich einwirken müssen. Tatsächlich geht auch aus den beiden Versuchsreihen hervor, daß mit dem Erreichen einer p_H von etwa 1,5 ein nennenswertes Wachstum nicht mehr stattfindet. Diese gesteigerte Säureproduktion in stickstoffreien Kulturen ist von allen früheren Autoren unbeachtet geblieben, und in dieser Vernachlässigung ist der Schlüssel über die sich widersprechenden Resultate zu finden. Dazu kommt weiterhin, daß die absoluten Mengen der gebildeten Säuren bei den einzelnen *Aspergillus*-Rassen großen Schwankungen unterliegen. Es darf deshalb bei solchen Rassendifferenzen und verschiedenen Versuchsanordnungen nicht wundern, daß die einen Autoren (Ternetz, Saida) eine Stickstoffassimilation zu konstatieren meinten, während die anderen (Czapek, Duggar) ihr Vorhandensein ebenso energisch bestritten. Unterzieht man die Säurebildung in beiden Versuchsreihen einer näheren Betrachtung, so zeigt sich, daß bei geringerer Temperatur gezogene Kulturen in jeder Beziehung die saureren sind. Unterlegt man nun auch diesen Differenzen der beiden Kulturreihen die verschiedenen Myzelernten, so fallen die Unterschiede noch weit mehr ins Auge: denn in der Versuchsreihe 2 wird die viel größere Säuremenge von einem Myzel erzeugt, das im Endeffekt nur die Hälfte von dem Myzelgewicht des Pilzes der dritten Versuchsreihe besitzt. So wird also von der gleichen Myzelmenge die Säure im Verhältnis 2,6 : 1 gebildet.

Vergleicht man die Unterschiede in der Säurebildung bezw. Anhäufung innerhalb der beiden Kulturreihen nun auch noch wiederum rückwärts mit den Differenzen im Glukoseverbrauch, so ergibt sich die merkwürdige Tatsache, daß diese hier gerade umgekehrt angeordnet sind: Die Versuchsreihe 2 zeigt im Endeffekt einen Verbrauch von 2,54 g Glukose und eine Säureproduktion,

die 243,3 ccm n/10 Alkali entspricht, die Versuchsreihe dagegen mit dem höheren Glukoseverbrauch von 4,08 g die geringere Azidität entsprechend 166,5 ccm n/10 Alkali.

Da zur Erklärung dieser Differenzen keineswegs etwa der Gewichtsunterschied der Myzelernten herangezogen werden kann, so bleibt nur die Annahme übrig, daß bei der höheren Temperatur durch den Pilz zwar auch die entsprechenden Säuremengen vorher gebildet wurden, diese dann aber sekundär weiter verarbeitet und als CO_2 abgegeben worden sind.

Aus den Tabellen geht weiter hervor, daß in den Kulturen bei höherer Temperatur mit dem höheren Myzelgewicht auch eine höhere Stickstoffassimilation erreicht wird. Bislang war die Frage offen geblieben, ob dieses stärkere Myzelwachstum und der höhere Stickstoffgewinn als eine direkte oder indirekte Funktion der Temperatur aufzufassen sind, oder ob nicht am Ende nur die geringere Azidität der bei höherer Temperatur gezogenen Kulturen die Ursache dafür ist. Die Möglichkeit einer Prüfung dieser Frage ergibt sich durch die Neutralisation der gebildeten Säuren mit Kalziumkarbonat. Zu diesem Zwecke wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt, und die einen Kulturlösungen mit 0,5 g, die anderen mit 1,0 g Kalziumkarbonat versetzt, wobei jede Kulturreihe einmal bei 20—22° und bei 30—32° C aufgestellt wurde; die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 4 und 5 wiedergegeben.

Will man jedoch zu einer fehlerfreien Beurteilung der Versuchsresultate kommen, so muß man von vornherein berücksichtigen, daß die Kulturbedingungen durch die Zugabe von Kalziumkarbonat noch in anderer Weise berührt werden. War die Ausgangs-p_H der karbonatfreien Kulturen 4,62, so ist diese bei den mit Karbonat versetzten eine wesentlich andere, nämlich 7,68. Darum darf es auch nicht wundernehmen, daß der Verlauf der Versuche anfänglich ein ganz anderer war als bei den früheren. In den ersten Tagen war überhaupt noch kaum ein sichtbares Myzel vorhanden, so daß eine Analyse der Kulturen nach 8 Tagen noch nicht vorgenommen werden konnte, sondern erst vom 16. Tage ab. Die Analysenergebnisse in Tabelle 4 zeigen, daß das Myzelwachstum bis zum 32. Versuchstage gehemmt wird. Um den Gesamtverlauf des Myzelwachstums in den mit Kalziumkarbonat versetzten Kulturen zu interpretieren, ist ein Vergleich mit karbonatfreien notwendig; es seien dazu die Kulturreihe 3, d. h. die karbonat-

Tabelle 4. Versuchsreihe 4.

Kulturdauer Tage	8				16				24			
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$,											
Versuch Nr. . .	43	44	45	Mittel	46	47	48	Mittel	49	50	51	Mittel
Azidität . . ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
p_H	—	—	—	—	7,62	7,49	7,57	**7,56**	7,48	7,27	7,40	**7,38**
Myzelgewicht mg	—	—	—	—	14,99	17,15	14,39	**15,51**	27,54	34,33	30,91	**30,92**
Stickstoffgehalt des Myzels mg	—	—	—	—	0,15	0,23	0,15	**0 17**	0,34	0,40	0,39	**0,38**
Stickstoffgehalt des Myzels in %	—	—	—	—	1,07	1,34	0,99	**1,14**	1,21	1,16	1,22	**1,19**
Stickstoffgehalt d. Nährlösung mg	—	—	—	—	0,54	0,57	0,62	**0,58**	0,74	0,79	0,71	**0,75**
Gesamtstickstoff-assimilation mg	—	—	—	—	0,69	0,80	0,77	**0,75**	1,08	1,19	1,09	**1,12**
Glukose . . . . g	—	—	—	—	4,30	4,48	4,58	**4,45**	3,72	3,60	3,61	**3,64**
Glukose-verbrauch . . g	—	—	—	—	0,70	0,52	0,42	**0,54**	1,28	1,44	1,49	**1,39**

Tabelle 5. Versuchsreihe 5.

Kulturdauer Tage	8				16				24			
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$,											
Versuch Nr. . .	61	62	63	Mittel	64	65	66	Mittel	67	68	69	Mittel
Azidität . . ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	125,7	108,2	118,9	**117,6**
p_H	7,62	7,64	7,52	**7,59**	7,58	7,66	7,51	**7,61**	2,75	3,01	2,86	**2,87**
Myzelgewicht mg	10,04	14,35	12,90	**12,43**	26,31	21,55	24,31	**24,06**	91,05	84,71	86,34	**87,37**
Stickstoffgehalt des Myzels mg	0,13	0,16	0,14	**0,14**	0,31	0,23	0,29	**0,28**	1,06	1,02	0,94	**1,01**
Stickstoffgehalt des Myzels in %	1,29	1,14	1,06	**1,16**	1,18	1,09	1,19	**1,15**	1,17	1,21	1,09	**1,16**
Stickstoffgehalt d. Nährlösung mg	—	0,55	0,57	**0,56**	0,84	0,76	0,77	**0,78**	1,66	1,53	1,80	**1,66**
Gesamtstickstoff-assimilation mg	—	0,71	0,70	**0,71**	1,15	0,99	1,06	**1,07**	2,72	2,55	2,74	**2,67**
Glukose . . . . g	4,81	4,68	4,71	**4,73**	3,80	4,04	3,91	**3,92**	2,07	2,18	2,31	**2,19**
Glukose-verbrauch . . g	0,19	0,32	0,29	**0,27**	1,20	0,96	1,09	**1,08**	2,93	2,81	2,69	**2,81**

Temperatur: 20—22 ° C.

32				40				48			
0,001 $FeCl_3$, 0,5 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O											
52	53	54	Mittel	55	56	57	Mittel	58	59	60	Mittel
27,38	18,52	—	**22,95**	199,2	185,4	194,3	**192,9**	218,7	224,1	223,1	**221,6**
3,88	4,01	—	**3,99**	1,63	1,79	1,60	**1,64**	1,48	1,47	1,52	**1,49**
58,17	51,94	48,30	**52,80**	111,28	97,57	108,94	**105,93**	123,55	115,48	114,60	**117,88**
0,62	0,60	0,49	**0,57**	1,05	0,98	1,00	**1,01**	1,14	1,10	1,04	**1,10**
1,06	1,16	1,01	**1,08**	0,94	1,00	0,92	**0,95**	0,92	0,95	0,91	**0,93**
0,88	0,82	0,85	**0,85**	2,16	1,84	2,45	**2,27**	2,26	2,15	2,46	**2,30**
1,50	1,42	1,34	**1,39**	3,21	3,82	3,46	**3,16**	3,40	3,25	3,50	**3,38**
2,85	2,41	2,81	**2,82**	1,41	1,62	1,50	**1,51**	1,54	1,38	1,43	**1,45**
2,15	2,19	2,19	**2,18**	3,59	3,38	3,50	**3,49**	3,46	3,62	3,57	**3,55**

Temperatur: 30—32 ° C.

32				40				48			
0,001 $FeCl_3$, 0,5 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O											
70	71	72	Mittel	73	74	75	Mittel	76	77	78	Mittel
155,3	146,5	156,7	**152,7**	171,5	164,3	168,9	**168,2**	191,5	194,7	157,2	**194,5**
2,54	2,71	2,70	**2,65**	2,54	2,18	2,59	**2,44**	2,01	2,32	2,25	**2,19**
128,43	98,93	110,57	**112,64**	181,88	135,74	143,83	**140,48**	158,74	165,39	171,54	**165,22**
1,32	0,97	1,05	**1,12**	1,31	1,41	1,41	**1,38**	1,31	1,50	1,54	**1,45**
1,03	0,98	0,95	**0,97**	0,92	1,02	0,94	**0,96**	0,83	0,90	0,90	**0,89**
1,83	2,07	2,13	**2,01**	2,38	2,07	2,11	**2,19**	2,56	3,53	2,41	**2,83**
3,25	3,04	3,18	**3,16**	3,74	3,49	3,52	**3,58**	3,87	4,03	3,95	**3,95**
1,57	1,91	1,69	**1,73**	1,35	1,46	1,32	**1,38**	0,75	0,84	0,77	**0,79**
3,43	3,09	3,31	**3,28**	3,65	3,54	3,68	**3,62**	4,25	4,16	4,23	**4,21**

freien Versuche bei 30—32° C, und die vorliegende Kulturreihe 4 mit 0,5 g Kalziumkarbonat pro Kultur gewählt; denn in beiden Versuchsreihen war tatsächlich fast das gleiche Myzelgewicht nach 48 Versuchstagen zustande gekommen. In dieser karbonatfreien Versuchsreihe verläuft das Wachstum mit einer ständigen Verdoppelung des Myzelgewichtes bis zum 24. Tage; von da ab erfolgt eine langsamere Zunahme, wobei die einzelnen Zuwachsdifferenzen stetig fallen. In den karbonathaltigen Kulturen dagegen entsteht in den ersten 8 Tagen — wie schon erwähnt — überhaupt kein wägbares Myzel; dann erst erfolgt eine Zunahme, die in aufeinanderfolgenden 8 Tagen je eine Verdoppelung des Myzelgewichtes zur Folge hat, so daß nach 32tägiger Kulturdauer ein Gewicht von 50 mg erreicht wird. In den wiederum folgenden 8 Tagen erfolgt nochmals eine Verdoppelung des Pilzdeckengewichtes, so daß mit einem Sprunge ein Myzelgewicht von über 100 mg erreicht wird. Auffälliger noch läßt sich dieser Sprung an dem in dieser Zeit liegenden erheblichen Stickstoffgewinn illustrieren, der in der Tabelle 4 1,3 mg, also mehr als ein Drittel der Gesamtassimilation beträgt.

Dieser plötzliche Sprung in der Zunahme des Myzelwachstums und der Stickstoffassimilation steht offenbar in direktem Zusammenhang mit der Reaktionsänderung, die sich in der gleichen Zeit in den Kulturen vollzogen hat. Hat sich innerhalb der ersten 32 Tage mit fortschreitender Absättigung der gebildeten Säuren durch das Kalziumkarbonat die $H^{\cdot}$-Konzentration fast auf der gleichen Höhe gehalten (Ausgangs-$p_H = 7{,}6$; p_H nach 32 Tagen im Mittel $= 7{,}2$), so erfolgt zwischen dem 32. und 40. Tage nach völligem Verbrauch des Kalziumkarbonats ein Absinken des p_H auf 1,64, um endlich nach 48 Tagen noch bis auf 1,49 im Mittel zu fallen. Der Wachstumssprung und die Reaktionsänderung liegen also im gleichen Zeitintervall. In der Zeit vom 40. bis zum 48. Tage ist die maximale Säuerung erreicht, und das Myzelwachstum sinkt wieder rasch ab. Aus der Versuchsreihe 4 geht also hervor, daß, wenn die organischen Säuren durch Kalziumkarbonat abgefangen werden, Myzelgewicht und Stickstoffassimilation in ihren Endwerten sich denjenigen der karbonatfreien bei 30—32° C nähern. Daraus ergibt sich weiter, daß das höhere Myzelgewicht und die Stickstoffassimilation bei 30—32° C nicht durch die höhere Temperatur direkt, sondern durch den Einfluß der Temperatur auf die Säureanhäufung zustande kommt.

Die Versuchsreihe 5 wurde unter Bedingungen durchgeführt, die eine Kombination der beiden Faktoren erlaubte, indem diese Kulturreihe mit 0,5 g Kalziumkarbonat bei 30—32° C angestellt wurde. Die in der Tabelle 5 dargestellten Resultate zeigen, daß die Säuerung nach der Reaktionsänderung, die hier etwas früher erfolgt, erheblich langsamer vor sich geht. Die Ursache dieser verzögerten Säuerung ist eben wiederum durch die höhere Temperatur bedingt; dadurch wird auch ein Wachstum des Myzels über längere Zeitdauer hinaus ermöglicht, bis die Hemmungsazidität erreicht ist. Die Tabelle zeigt, daß ein immerhin noch erheblicher Myzelzuwachs selbst in den 14 Tagen nach der Reaktionsänderung zustande kam, und daß nach 48 Tagen ein Myzel von 165 mg bei einer Stickstoffassimilation von 3,9 mg resultierte. Es zeigt sich hier auch wieder mit aller Deutlichkeit die enge Abhängigkeit des Myzelwachstums von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung.

Die beiden folgenden Versuchsreihen 6 und 7 wurden nun mit der Fragestellung angestellt, ob es möglich ist, mit einer noch größeren Kalziumkarbonatmenge, nämlich mit 1,0 g, auch entsprechend höheren Stickstoffgewinn und höheres Myzelgewicht zu erlangen. Dieses Ziel wurde erreicht; doch stand der Mehrgewinn in keinem Verhältnis zu der Erhöhung des Kalziumkarbonatzusatzes. Dies erklärt sich durch die Hemmung der länger andauernden Alkalität. Die Reaktionsänderungen traten bei 20—22° C erst nach dem 40. Tage, bei 30—32° C ungefähr nach dem 32. Tage der Kulturdauer ein. Trotz alledem sind höhere Werte an assimiliertem Stickstoff und an Myzelgewicht erreicht worden.

Endlich sei noch über eine kleinere Kulturreihe (vgl. Tab. 8) berichtet, die bei 14—16° C ohne Kalziumkarbonat angesetzt wurde. Diese ergab zwar keine neuen prinzipiellen Einsichten, sondern läßt sich von dem Vorhergesagten ohne weiteres ableiten; doch beansprucht sie bezüglich ihrer quantitativen Ergebnisse besonderes Interesse. Wie zu erwarten war, erfolgt bei der tieferen in dieser Versuchsreihe verwendeten Temperatur eine so rasche Säuerung, daß die nach 48 Tagen erhaltenen Myzelgewichte kaum über 10 mg hinaus kamen. Geradezu erstaunlich sind die von dem so geringen Myzel erzeugten Säuremengen, die mit 0,3 g Glukon- und 0,3 g Oxalsäure ungefähr das 30fache ihres Myzelgewichtes darstellen.

Tabelle 6. Versuchsreihe 6.

Kulturdauer Tage	8				16				24			
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 g Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$,											
Versuch Nr. . .	79	80	81	Mittel	82	83	84	Mittel	85	86	87	Mittel
Azidität . . ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
p_H	—	—	—	—	7,48	7,62	7,56	**7,55**	7,52	7,41	7,49	**7,47**
Myzelgewicht mg	—	—	—	—	16,48	12,93	18,00	**15,80**	27,04	25,92	30,64	**27,87**
Stickstoffgehalt des Myzels mg	—	—	—	—	0,21	0,15	0,19	**0,18**	0,29	0,28	0,30	**0,29**
Stickstoffgehalt des Myzels in %	—	—	—	—	1,25	1,14	1,07	**1,15**	1,08	1,10	0,99	**1,06**
Stickstoffgehalt d. Nährlösung mg	—	—	—	—	0,57	0,51	0,61	**0,56**	0,78	0,80	0,86	**0,82**
Gesamtstickstoff-assimilation mg	—	—	—	—	0,77	0,65	0,80	**0,74**	1,08	1,09	1,16	**1,11**
Glukose . . . g	—	—	—	—	4,38	4,53	4,46	**4,46**	3,82	3,76	3,67	**3,75**
Glukose-verbrauch . g	—	—	—	—	0,62	0,47	0,54	**0,54**	1,18	1,24	1,33	**1,25**

Tabelle 7. Versuchsreihe 7.

Kulturdauer Tage	8				16				24			
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 g Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$,											
Versuch Nr. . .	97	98	99	Mittel	100	101	102	Mittel	103	104	105	Mittel
Azidität . . ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
p_H	7,68	7,60	7,58	**7,62**	7,49	7,62	7,49	**7,33**	7,50	7,21	7,42	**7,38**
Myzelgewicht mg	14,74	11,35	11,63	**12,57**	25,37	27,54	20,38	**24,43**	40,00	36,92	42,37	**39,77**
Stickstoffgehalt des Myzels mg	0,15	0,13	0,17	**0,15**	0,28	0,27	0,25	**0,27**	0,52	0,35	0,49	**0,45**
Stickstoffgehalt des Myzels in %	1,02	1,11	1,44	**1,19**	1,09	0,99	1,23	**1,10**	1,30	0,95	1,15	**1,13**
Stickstoffgehalt d. Nährlösung mg	0,47	0,55	0,49	**0,50**	0,76	0,82	0,63	**0,75**	0,73	0,82	0,76	**0,77**
Gesamtstickstoff-assimilation mg	0,62	0,68	0,65	**0,65**	1,03	1,09	0,88	**1,00**	1,26	1,17	1,25	**1,23**
Glukose . . . g	4,51	4,68	4,65	**4,61**	3,99	3,89	4,02	**3,96**	3,52	2,57	2,55	**2,55**
Glukose-verbrauch . g	0,49	0,32	0,35	**0,39**	1,01	1,11	0,98	**1,03**	2,48	2,43	2,45	**2,45**

Temperatur: 20—22° C.

32				40				48			
0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O											
88	89	90	Mittel	91	92	93	Mittel	94	95	96	Mittel
—	—	—	—	—	—	—	—	282,5	266,9	290,3	**279,9**
7,42	7,21	7,25	**7,29**	7,12	7,39	7,09	**7,20**	1,98	2,01	1,87	**1,95**
45,60	49,00	51,80	**48,53**	64,27	65,73	70,32	**66,77**	160,64	150,00	161,94	**157,26**
0,44	0,51	0,52	**0,49**	0,65	0,73	0,74	**0,71**	1,80	1,44	1,60	**1,61**
0,96	1,05	1,00	**1,00**	1,02	1,11	1,05	**1,06**	1,14	0,96	0,98	**1,03**
1,04	0,98	0,90	**0,98**	1,51	1,47	1,71	**1,56**	2,41	2,65	2,23	**2,43**
1,48	1,49	1,42	**1,46**	2,16	2,20	2,44	**2,27**	4,21	4,09	3,82	**4,04**
2,74	2,59	2,70	**2,68**	2,00	1,84	1,64	**1,83**	—	—	—	—
2,26	2,41	2,30	**2,32**	3,00	3,16	3,36	**3,17**	5,00	5,00	5,00	**5,00**

Temperatur: 30—32° C.

32				40				48			
0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O											
106	107	108	Mittel	109	110	111	Mittel	112	113	114	Mittel
—	11,22	—	**11,22**	160,2	141,9	153,2	**151,8**	147,2	150,4	137,1	**144,9**
7,37	4,01	7,28	**6,22**	2,25	2,39	2,27	**2,30**	2,32	2,02	1,96	**2,15**
55,17	91,92	53,52	**66,87**	130,40	146,44	133,71	**136,85**	164,37	186,00	189,20	**179,85**
0,78	0,99	0,61	**0,79**	1,34	1,40	1,37	**1,37**	2,22	2,32	2,08	**2,21**
1,40	1,07	1,14	**1,20**	1,03	0,95	1,02	**1,00**	1,34	1,24	1,10	**1,22**
0,84	1,95	0,99	**1,26**	2,03	2,20	2,17	**2,13**	1,95	2,03	2,30	**2,09**
1,61	2,94	1,60	**2,05**	3,37	3,60	3,54	**3,50**	4,16	4,35	4,38	**4,30**
0,82	0,57	0,89	**0,76**	—	—	—	—	—	—	—	—
4,18	4,43	4,11	**4,24**	5,00	5,00	5,00	**5,00**	5,00	5,00	5,00	**5,00**

Tabelle 8. Versuchsreihe 8.

Temperatur: 14—16° C.

Versuch Nr.	115	116	117	118	119	120
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose,	0,1 KH_2PO_4,	0,02 $MgSO_4$,		0,001 $FeCl_3$	
			zu 100 ccm H_2O.			
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	23,05	54,42	81,80	72,37	88,05	90,34
p_H	2,74	2,24	1,89	1,94	1,79	1 76
Glukonsäure a. d. Azidität berechnet . . . . g	—	—	0,255	0,180	0,233	0,300
Kalziumoxalat . . . g	0,113	0,339	0,450	0,408	0,503	0,495
Oxalsäure . . . . g	0,070	0,209	0,277	0,251	0,310	0,305
Myzelgewicht . . mg	—	5,73	9,30	10,48	12,59	11,08

3) Einfluß höherer Zuckerkonzentrationen der Nährlösungen auf die Luftstickstoffassimilation.

In anderem Zusammenhang wurden weitere Versuchsreihen aufgestellt, deren Nährlösungen dahin variiert wurden, daß sie bei 1,0 g Kalziumkarbonatzugabe auch wechselnde Glukosekonzentration enthielten. In zwei Reihen wurden sowohl bei 20—22° als auch bei 30—32° 10% Glukoselösungen und bei einer dritten eine 15% Glukoselösung unter den sonst gleichartigen Bedingungen verwendet (siehe Tabelle 17, 18, 19). Die Endresultate dieser Versuche sind sehr auffällig, insofern als die Myzelgewichte wie auch die assimilierten Stickstoffmengen genau denselben Zahlen entsprechen wie bei den Versuchen mit nur 5% Glukosekonzentrationen. Man hätte erwarten können, daß eine Erhöhung des Glukosegehaltes auch eine Steigerung des Myzelwachstums und der Stickstoffassimilation zur Folge hätte, zudem der Glukoseverbrauch in karbonathaltigen und bei 30—32° gezogenen Kulturen auch gesteigert ist. Aus der Tatsache, daß dies nicht zutrifft, muß geschlossen werden, daß die maximalen, in diesen Kulturen erhaltenen Myzelernten und Stickstoffmengen von ± 4 mg unter den gegebenen Bedingungen die obere Grenze des überhaupt assimilierbaren Luftstickstoffes darstellen.

4) Verlauf der Luftstickstoffassimilation bei Vorhandensein von gebundenem Stickstoff.

Ganz besonders wird diese Auffassung durch eine weitere Versuchsreihe illustriert, deren Einzelheiten ebenfalls später dar-

gestellt werden. Diese Versuche wurden unter denselben Bedingungen nämlich wieder mit 5% Glukosenährlösung, 1,0 g Kalziumkarbonat und den üblichen Nährsalzen, aber mit geringen Zusätzen von gebundenem Stickstoff in Form von Ammoniumtartrat angestellt. Die zugegebenen Stickstoffmengen betrugen in je einer Versuchsreihe von ebenfalls sechs Kulturen 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 und 12,0 mg. Nach 8 Tagen wurde stets eine Kultur einer Versuchsreihe analog den obigen analysiert. Die hier interessierende Fragestellung war die, ob in einer Nährlösung, die gebundenen Stickstoff enthält, noch eine Assimilation elementaren Stickstoffs stattfindet. Bei einer Stickstoffzugabe von 0,5 mg (siehe Tabelle 23) wurde nach 48 Tagen eine Gesamtstickstoffmenge von 4,31 mg bestimmt, die einer Luftstickstoffassimilation von 3,81 mg entspricht. Bei einem Vergleiche mit der analogen stickstoffreien Kultur (siehe Tabelle 6) zeigt sich, daß die Gesamtmengen an vorhandenem Stickstoff mit diesem Werte ungefähr übereinstimmen, daß aber die Luftstickstoffassimilation bereits etwas eingeschränkt ist.

Prinzipiell verläuft der Prozeß bei weiteren Stickstoffzugaben so, daß bis 4 mg Zugabe zu den Kulturen im Endeffekt stets etwa die gleiche Stickstoffmenge gefunden wurde, die maximal in stickstoffreien Kulturen aus der Luft assimiliert wurde. Zugleich damit sinkt auch der Glukoseverbrauch gegenüber den stickstofffreien Kulturen mit zunehmenden Stickstoffgaben, was wiederum den unmittelbaren Zusammenhang zwischen Energiebedarf und Luftstickstoffassimilation zeigt. Diese letzten Versuchsreihen lieferten also ein überraschendes Resultat: Die Luftstickstoffassimilation wurde durch Zugabe gebundener Stickstoffmengen nicht gefördert, sondern tatsächlich unterdrückt. Diese Unterdrückung läuft aber stets nur soweit, daß im Gesamtresultat die obere Stickstoffmenge optimaler Bedingungen, nämlich etwa 4 mg, nicht unterschritten wird. Bleibt die zugegebene Stickstoffmenge darunter, so wird solange Luftstickstoff dazu assimiliert, bis sie erreicht ist; überschritten wird sie aber nicht. In Übereinstimmung mit den vorhergehenden Versuchen mit höheren Glukosekonzentrationen zeigt auch diese Reihe, daß bei einem Stickstoffgehalt von rund 4 mg der weiteren Assimilation des Luftstickstoffs eine Grenze gesetzt ist.

Schon einmal ergab sich bei den ursprünglich stickstofffreien Kulturen eine Grenze in der Menge des produzierten Myzels und des assimilierten Stickstoffes. Diese Grenzwerte lagen aber erheb-

lich tiefer; denn es resultierten bei 20—22° C als maximale Ausbeuten Myzelien von 70 mg Erntegewicht im Mittel mit einem Stickstoffgewinn von 2,5 mg. Es ließ sich aber zeigen, daß dies keine absoluten Werte waren, sondern beide konnten durch die Säuredrosselung — entweder durch Kalziumkarbonatzusatz oder durch höhere Temperatur — bedeutend erhöht werden.

Etwas ganz anderes scheint aber nun bei diesen Grenzwerten von etwa 4 mg assimiliertem Luftstickstoff und 170 mg Myzeltrockengewicht vorzuliegen; denn unter den Bedingungen, wie ich sie bei diesen Versuchen hatte, konnte diese nicht mehr überschritten werden. Glukosemenge, zugegebene Stickstoffmenge, Temperatur und Säureproduktion kommen als begrenzende Faktoren für diesen zweiten Höchstwert nicht mehr in Frage. Eine weitere Erklärung dieser Resultate dürfte allerdings nicht einfach sein; denn die Anzahl möglicher Variationen ist noch sehr groß, doch können einige Umrißlinien angegeben werden. So können die allgemeinen Kulturbedingungen, wie die Flüssigkeitsmenge, die Oberfläche derselben oder die eingesäte Sporenmenge, zum Teil mitbestimmende Faktoren sein, in erster Linie dürfte aber doch wieder an Stoffwechselprodukte zu denken sein. Wie sich in den ersten Versuchen die Säuren bereits als begrenzende Faktoren für Wachstum und Stickstoffassimilation erwiesen haben, so können es hier die übrigen Produkte des Stoffwechsels sein. Die anorganischen Salze scheinen kaum irgendwelche Rolle dabei zu spielen; denn Variationen des Kaliumphosphat-, Magnesiumsulfat- und Eisenchloridgehaltes der Nährlösungen in orientierenden Versuchen verliefen ergebnislos.

c) Luftstickstoffassimilation bei verschiedenen Rassen des *Aspergillus niger*.

Soweit gingen die Untersuchungen mit dem *Aspergillus niger* Tübingen über das Problem der Stickstoffassimilation. Die oft festgestellten Rassenverschiedenheiten bei den einzelnen Stämmen des *Aspergillus niger* einerseits und die Tatsache zum anderen, daß es sich bei dem Tübinger Pilz um eine frisch aus der Natur isolierte Form handelt, ließen es geboten erscheinen, die gleichen Untersuchungen auch noch an einer Reihe von anderen *Aspergillus*-Stämmen anzustellen, wobei besonderer Wert auf solche gelegt wurde, die sich seit langer Zeit in Kultur befinden. Dazu wurden die drei Mutanten von *Aspergillus niger*, wie schon einleitend erwähnt, der *Aspergillus niger cinnamomeus montanus*, *Aspergillus*

niger fuscus montanus und *Aspergillus niger* var. *altipes*, gewählt, über deren Entstehung E. Schiemann (1912) berichtet hat. Diese drei Stämme wurden aus dem Zentralbureau für Schimmelkulturen, Baarn, bezogen, und es ist deshalb ausgeschlossen, daß diese Formen seit mindestens 17 Jahren im Sinne Kostytschews (1926) eine Bodenpassage durchgemacht haben. Außer diesen wurden noch die anderen im methodischen Teil angegebenen Pilzstämme in den Kreis der Untersuchungen einbezogen. Die Pilze wurden gleichzeitig auch auf ihr Säurebildungsvermögen untersucht; infolgedessen sind die gesamten experimentellen Daten, aus denen sich ihre physiologischen Konstanten entnehmen lassen, ausführlich im zweiten Teil der Arbeit dargestellt. Im wesentlichen wird hier nur angeführt, was auf die Luftstickstoffassimilation direkt Bezug hat.

Allgemein sei bemerkt, daß alle Rassen bei hinreichend günstigen Bedingungen in der Lage waren, Luftstickstoff zu assimilieren; und auch sonst entsprach der Verlauf des Prozesses dem, was bei *Aspergillus niger* Tübingen gefunden wurde. Bei sämtlichen Rassen ließ sich als wesentlichste Hemmung des Myzelwachstums die ungewöhnliche Steigerung der Säurebildung feststellen, und ebenso war es möglich, diese Hemmung zeitweise durch eine Erhöhung der Temperatur oder durch Zugabe von Kalziumkarbonat zu beseitigen. Es dürfte also kein Zweifel darüber bestehen, daß das Vermögen, den Luftstickstoff zu assimilieren, eine ganz allgemeine Eigenschaft der verschiedensten Rassen von *Aspergillus niger* ist und offenbar auch durch eine lang dauernde Kultur nicht beeinflußt wird.

Betrachtet man nun aber den Verlauf dieses Vorgangs quantitativ und im einzelnen, so ergeben sich starke Unterschiede. Diese sind meistens so einschneidend, daß eine quantitative Vergleichung der Leistungsfähigkeit der einzelnen Rassen sehr erschwert, ja unmöglich gemacht wird; denn schon durch geringes Myzelwachstum werden die Bedingungen bei gleichartig angestellten Kulturen so sehr verschoben, daß eine fehlerfreie Vergleichung nicht mehr möglich ist. Von besonderem Interesse ist dabei, daß sich irgend eine ausgezeichnete Richtung im Unterschied zwischen den Rassen nicht feststellen ließ; sowohl die Schiemannschen Mutanten, als auch die beiden Pilze von Wehmer und der *Citromyces* wichen unter sich ebensosehr wie von dem *Aspergillus niger* Tübingen ziemlich willkürlich in jeder Beziehung ab. Das bedeutet, daß die

drei Mutanten, deren Auftreten genau beobachtet worden ist, sich nun mindestens physiologisch in gar keiner Weise anders verhalten als aus der Natur isolierte Rassen; daher liegt die Vermutung nahe, daß die unkontrollierbaren Rassenbildungen den von E. Schiemann beobachteten Mutationsprozessen parallel laufen. Im folgenden seien einige Einzelheiten dieser Rassendifferenzen hinsichtlich des Assimilationsvermögens des Luftstickstoffs diskutiert, und, soweit es geht, sei gleichzeitig auch ein physiologisches Bild des betreffenden Stammes entworfen; freilich sind diese Charakteristika noch im zweiten Teil durch das Säurebildungsvermögen zu ergänzen.

Nimmt man zunächst das spezifische Verhalten des *Aspergillus niger* Tübingen gegen Azidität bezw. Alkalität des Nährsubstrates zum Vergleichsmaßstab, so zeigt sich, daß die untersuchten Rassen bald nach der einen, bald nach der anderen Richtung davon abweichen. So stellte sich beispielsweise in orientierenden Vorversuchen heraus, daß eine zufällig herausgegriffene Rasse, nämlich der *Aspergillus niger ficuus*, der nach den nun schon gewonnenen Erfahrungen unter besonders günstige Wachstumsbedingungen versetzt werden sollte und auf eine karbonathaltige Kulturlösung bei 30—32° C gebracht wurde, versagte und zu keinem nennenswerten Myzelwachstum kam. Die Ursache davon war, wie sich bald ergab, eine außerordentliche Empfindlichkeit gegen die alkalische Reaktion des Nährmediums, die der Tübinger *Aspergillus* ohne weiteres überwand. Da andererseits sein Säurebildungsvermögen doch auch so beträchtlich ist, daß seine Nährlösung in karbonatfreier Kultur bei 20—22° C schon nach 24 Tagen einen p_H von 1,89 aufwies und der Pilz dabei sein Wachstum einstellte, gelangte der *Aspergillus niger ficuus* auch unter dieser Bedingung zu einem nur geringen Myzel. Allein bei 30—32° C in karbonatfreier Lösung konnte ein ansehnliches Myzelwachstum ermöglicht werden, da allein unter diesen Bedingungen die aktuelle Azidität eine geringere bleibt. Die Myzelernte betrug 141,72 mg, und der Stickstoffgewinn 2,87 mg (vgl. Tabelle 36, Versuch 303).

Dies eine Beispiel zeigt schon mit Deutlichkeit, wie vorsichtig ein etwaiger Vergleich bei den einzelnen Rassen in quantitativer Hinsicht durchgeführt werden muß. Bei der Besprechung der ersten Versuchsreihe mit dem *Aspergillus niger* Tübingen war schon darauf hingewiesen worden, daß ein Vergleich karbonatfreier und karbonathaltiger Kulturen nie ganz fehlerfrei sein kann. Es ergibt sich ohne weiteres, daß dies in noch höherem Maße für

Rassen gilt, bei denen einmal wie beim *Aspergillus niger* Tübingen karbonathaltige Nährlösung bei 30—32° C und im anderen Falle das kalziumkarbonatfreie Substrat bei derselben Temperatur die Optima darstellen. Es folgen nun die physiologischen Charakteristika der einzelnen Rassen, worin zugleich in gedrängter Zusammenfassung die Resultate über ihre Fähigkeit, den Luftstickstoff zu assimilieren, enthalten sind.

1. *Aspergillus niger* Tübingen. Er bildet in kalziumkarbonatfreien Kulturen bei 20—22° C mit 74 mg das höchste Myzelgewicht von allen untersuchten Rassen. Seine Empfindlichkeit gegen die Alkalität des Nährmediums ist deutlich, aber immerhin noch in solchen Grenzen, daß er in alkalischer Lösung zu wachsen vermag. Seine Säureresistenz ist hoch, da er sein Wachstum erst bei einem p_H von etwa 1,5 einstellt. Der maximale Stickstoffgewinn betrug bei karbonathaltiger Kultur bei 30—32° C 4,30 mg (vgl. Tabelle 7).

2. *Aspergillus niger cinnamomeus montanus*. Dieser Pilz ist durch eine erheblich geringere Säureresistenz als der Tübinger *Aspergillus* ausgezeichnet, da er sein Myzelwachstum bereits bei einem p_H von 1,7 einstellt. Seine Empfindlichkeit gegen die Alkalität der Nährlösung ist dagegen wesentlich geringer; so erzeugt er in 24 Tagen bei 20—22° C in karbonathaltiger Kultur ein Myzel von 54 mg, während der *Aspergillus niger* Tübingen in derselben Zeit und unter denselben Bedingungen nur die Hälfte dieser Ernte zu produzieren vermag (vgl. Tabelle 33). Die Höchstmenge assimilierten Stickstoffs betrug 3,19 mg.

3. *Aspergillus niger* var. *altipes*. Er stellt sein Wachstum bei einer noch geringeren Azidität als die beiden vorhergehenden Pilze ein, indem dies bei einem p_H von 1,9 eingestellt wird. Seine Resistenz gegen Alkali ist offenbar noch größer als die des *Aspergillus niger* Göttingen, wie aus der Tabelle 37 hervorgeht. Bei einer verhältnismäßig mittleren Azidität ist das Myzelwachstum sehr beträchtlich, wie der Myzelzuwachs in derselben Versuchsreihe nach der Reaktionsänderung zeigt. Der maximale Stickstoffgewinn betrug 2,88 mg.

4. *Aspergillus niger fuscus montanus*. Dieser Pilz ist überaus säureempfindlich und selbst bei höherer Temperatur nur zu einer geringen Myzelentwicklung zu bringen. Auf karbonathaltigem Nährboden ist das Myzelwachstum zwar auch stark gehemmt, doch vermag sich immerhin eine Myzeldecke zu entwickeln. Auch hier

liegt deutlich bei mittlerer Azidität das Optimum des Myzelwachstums. Die Pilzdeckenernte betrug bei einer Stickstoffassimilation von 2,12 mg in maximo 104 mg (vgl. Tabelle 34).

5. *Aspergillus niger ficuus.* Dieser Pilz ist der alkaliempfindlichste der untersuchten Rassen. Er ist in karbonathaltigen Kulturen nur wenig über das Keimungsstadium der Sporen hinauszubringen. In saurer Lösung vermag er bei höherer Temperatur aber ein beträchtliches Myzel zu produzieren und etwa 3 mg Luftstickstoff zu assimilieren. Das Maximum seiner Säureresistenz liegt ungefähr bei p_H 1,8 (vgl. Tabelle 35 und 36).

6. Der *Aspergillus niger* Göttingen wächst auf karbonathaltiger Nährlösung am besten von den untersuchten Pilzrassen. Nach 32tägiger Kulturdauer betrug die Myzelernte in noch alkalisch reagierender Kulturlösung 80 mg. In saurer Lösung vermag er bei 20—22° C nur ein geringes Myzel zu bilden, das auch bei der Erhöhung der Temperatur auf 30—32° C nicht wesentlich zunimmt. Er besitzt also eine ausgesprochen geringe Säureresistenz ebenso wie der *Aspergillus niger fuscus mont.* Die optimale Stickstoffbindung des Pilzes betrug 2,27 mg (vgl. Tabelle 39).

7. *Citromyces* P_{23}. In saurer Nährlösung ist dieser Pilz bei 30—32° C wohl auf ein Myzelgewicht von ungefähr 25 mg zu bringen. Er stellt aber schon sein Myzelwachstum bei einem p_H von etwa 3,0 ein. Dasselbe geht auch aus den mit 0,5 g Kalziumkarbonat versetzten Nährlösungen der Versuchsreihe 40 hervor, bei der aber immerhin höhere Werte an Myzelgewichten erreicht wurden. Die maximale Stickstoffassimilation und das höchste Myzelgewicht dieses Pilzes sind mit 1,49 und 50 mg von den untersuchten Pilzen die geringsten.

Mit dieser kurzen Charakteristik der verschiedenen untersuchten Rassen sind ihre Unterschiede noch keineswegs vollkommen erfaßt. Im zweiten Teil der Arbeit wird zu zeigen sein, daß das Säurebildungsvermögen in quantitativer Hinsicht stark modifiziert ist, wie ja auch aus den schon angegebenen Werten der Gesamtazidität hervorgeht.

d) Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

Faßt man die Ergebnisse nun noch einmal kurz zusammen, so ließ sich zeigen, daß sämtliche sechs Rassen von *Aspergillus niger* sowie der *Citromyces* in der Lage sind, den Luftstickstoff zu assimilieren. Diese Assimilation ist aber nur möglich, wenn

eine leicht oxydierbare Kohlenstoffquelle, wie die Glukose, zur Verfügung steht. Die Wirkung der durch die eingehaltenen Kulturbedingungen gegebenen extremen Situation für den Pilz äußert sich darin, daß der Kohlenhydratverbrauch enorm gesteigert ist. Die durch die Oxydation der Glukose bezw. durch sonstige Stoffwechselprozesse gegebene Säuerung des Nährsubstrates hindert nach kurzer Zeit das Pilzwachstum, so daß es ohne besondere Maßnahme nur bei sehr säureresistenten Pilzrassen zu einer nennenswerten Stickstoffassimilation kommt. Die hemmende Wirkung der Säuren konnte entweder durch Neutralisation mit Kalziumkarbonat oder durch höhere Temperatur, wodurch ein Teil der gebildeten Säuren leichter weiter verbraucht wird, beseitigt werden. Eine unbegrenzte Assimilationsfähigkeit ließ sich aber auch durch die Beseitigung dieser Hemmung nicht erreichen; denn die maximalen Werte assimilierter Stickstoffmengen ließen sich mit dem *Aspergillus niger* Tübingen nur wenig über 4 mg hinaustreiben. Es ist anzunehmen, daß weitere, noch nicht erkannte Stoffwechselprodukte hier den begrenzenden Faktor darstellen. Eine Zugabe von gebundenem Stickstoff in die Nährlösung steigert die Assimilationsfähigkeit bemerkenswerterweise nicht, sondern hemmt sie, so daß sie mit steigender Zunahme von gebundenem Stickstoff abnimmt, und in den vorliegenden Versuchen schon mit einer Zugabe von 4 mg die obere Grenze der Assimilation erreicht wurde.

e) Besprechung einiger älteren Arbeiten.

An Hand dieser Ergebnisse lassen sich nun auch die widerspruchsvollen Resultate der vorhandenen Literatur über die Stickstoffassimilation zwanglos erklären. Als erstes kam eine methodische Fehlerquelle in Betracht, die darin bestand, daß eben mit der Makrokjeldahlmethode eine Bestimmung dieser geringen Stickstoffmengen mit zu großen Fehlern behaftet ist. Ternetz stellte zwar an Hand von Analysen mit 15,0, 3,0 und 1,5 mg Asparagineinwagen fest, daß sich mit dieser Methode solche Stickstoffmengen mit annähernder Richtigkeit bestimmen ließen. Diese Bestimmungen waren aber mit folgenden Fehlern behaftet: Bei 15 mg angewandter Substanz betrug der mittlere Fehler etwa 1 %, bei 3 mg 10 %, während der bei 1,5 mg Einwage gefundene Wert nahezu theoretisch war. Eine Methode mit so weiten Fehlergrenzen kann aber keineswegs für die Untersuchungen einer solchen umstrittenen Frage brauchbar sein. Es sei durchaus nicht bezweifelt, daß Ternetz

(Bd. 44, 1907, S. 353) der qualitative Nachweis von assimiliertem Stickstoff gelungen ist; denn der immerhin beträchtliche Glukoseverbrauch von 0,6 g für 17,4 mg Myzelernte läßt eine Stickstoffassimilation wahrscheinlich erscheinen. Bemerkenswert ist ferner auch in dieser Arbeit der Befund bei zwei *Phoma*-Arten, die übrigens weit mehr Luftstickstoff als der *Aspergillus niger* zu assimilieren vermögen, daß mit Zugabe von gebundenem Stickstoff in Form von Rhododendronblätterdekokt die Assimilation atmosphärischen Stickstoffs abnahm. Dies stimmt mit meinen Resultaten bei *Aspergillus niger* überein und dürfte für die Beurteilung des Mykorrhizenproblems von einiger Bedeutung sein. Die Leistung des einen Symbionten in der Stickstofflieferung zu suchen, scheint demnach wenig wahrscheinlich; denn es bleibt fraglich, ob den Pilzen in der Natur die Bedingungen für eine Assimilation atmosphärischen Stickstoffs überhaupt geboten sind.

Diesen positiven Beurteilungen stehen die derjenigen Autoren gegenüber, die dem *Aspergillus niger* die Fähigkeit elementaren Stickstoff zu bilden absprechen. Daß man sehr leicht zu diesem ablehnenden Standpunkt kommen kann, ergibt sich ohne weiteres aus der Tatsache, daß ohne gebundenen Stickstoff bei den meisten *Aspergillus*-Rassen auch kein Wachstum zu erzielen ist. Nun hat das zwar, wie diese Arbeit ergab, nichts mit der Unfähigkeit der Bindung des Luftstickstoffs zu tun, sondern ist nur eine Folge eines sekundären Vorganges, der enormen Erhöhung der Säureproduktion bezw. Säureanhäufung in den Nährlösungen. Da aber sämtliche Autoren diese Tatsache unbeachtet ließen, mußte die Ursache der Wachstumshemmung undurchsichtig bleiben, und in den allermeisten Fällen der Versuch, den *Aspergillus niger* zur Luftstickstoffassimilation zu zwingen, von einem Mißerfolg begleitet sein.

Die Bedenken Czapeks, daß gebundener Stickstoff aus der Luft während der langen Kulturdauer in die Kulturen gelangen könnte, sind zunächst durch meine Versuchsanordnung völlig beseitigt worden. Insbesondere lassen sich aber diese Bedenken dadurch zurückweisen, daß die Hauptstickstoffassimilation ständig in der Zeit der stärksten Wachstumszunahme erfolgte, wie aus sämtlichen karbonathaltigen Versuchen deutlich ersichtlich ist. Würde die Stickstoffassimilation durch Absorption gebundenen Stickstoffs nur vorgetäuscht, so wäre bei der überhaupt äußerst geringen Menge solcher in der Luft vorhandenen Verbindungen nur eine gleichmäßige Zunahme des Stickstoffs in den Kulturen

zu erwarten. Daß mit den eingeimpften Pilzsporen keine nachweisbaren Mengen gebundenen Stickstoffs in die Kulturen gelangten, hat die Tatsache gezeigt, daß noch nicht einmal von 200000 Sporen eine qualitativ einwandfreie Reaktion auf Stickstoff erhalten wird.

Im übrigen sind die meisten Arbeiten, die sich mit der Luftstickstoffassimilation beschäftigt haben, noch weniger exakt. Es seien nochmals die Faktoren zusammengestellt, die bei methodisch unglücklich angesetzten Versuchen eine Stickstoffassimilation verhindern oder verschleiern können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Wachstum in stickstoffreier Lösung auf ein Minimum reduziert wird, wenn man den Kulturen als Reizstoff Zinksulfat zusetzt, wie das häufig geschehen ist. Fängt man ferner die gebildeten und die angehäuften Säuren nicht ab, so wird früher oder später je nach der Säureresistenz der Pilzrasse das Wachstum nach meist geringen Anfängen eingestellt. Ist nun endlich den Kulturlösungen gebundener Stickstoff in relativ großer Menge zugegeben worden, wie es mehrere Autoren (u. a. Duggar) getan haben, um zu untersuchen, ob Luftstickstoff noch dazu assimiliert wird, so mußten diese Versuche ebenfalls negativ verlaufen, was wiederum nichts über die Assimilierbarkeit des elementaren Stickstoffs durch *Aspergillus*-Rassen aussagt. Es hat sich in dieser Arbeit zeigen lassen, daß z. B. bei dem *Aspergillus niger* Tübingen die untere Grenze der Stickstoffassimilation bereits nach einer Zugabe von 4 mg gebundenem Stickstoff erreicht war. Natürlich wäre es denkbar, daß diese Grenze sich bei anderen Rassen um ein Weniges verschieben läßt; sie aber viel höher als auf 60 mg — eine Stickstoffmenge, wie sie z. B. Duggar zugegeben hat — zu steigern, scheint äußerst unwahrscheinlich. Es sind also drei entscheidende Faktoren, die bei den Versuchsanstellungen der in der Literatur vorliegenden Arbeiten mehr oder weniger übersehen worden sind und die die Möglichkeit einer Luftstickstoffassimilation von vornherein ausschließen und deshalb scheinbar negative Resultate ergaben.

2. Säurebildung.

a) Problemstellung.

Die auffälligste Erscheinung bei der Luftstickstoffassimilation ist die hohe Azidität der Nährlösungen. Vergleicht man die produzierten Säuremengen von Kulturen, die von gebundenem Stickstoff

frei waren, mit solchen, die gebundenen Stickstoff enthielten, so zeigt sich, daß die Säureproduktion in den ersteren ein Mehrfaches der letzteren darstellt. In der Tabelle 22 sind die Daten von Kulturen zusammengestellt, die 30 mg gebundenen Stickstoff in Form von Ammoniumtartrat enthielten; auch in diesen immerhin noch stickstoffarmen Kulturen ist die Säurebildung der Pilze verhältnismäßig groß, trotzdem findet man unter völlig stickstoffreien Bedingungen noch eine ganz erhebliche Zunahme. So bildet das gleiche Myzel von *Aspergillus niger* Tübingen in stickstoffreien Kulturen 3,1mal mehr und das des *Aspergillus niger* Göttingen 8,7mal mehr Säure als in stickstoffhaltiger Kultur. Diese Resultate schienen wichtig genug, um den Anlaß zur Untersuchung des Säurestoffwechsels zu geben.

Die erste Aufgabe war, festzustellen, welche Säuren in den Kulturen gebildet werden. Nach den in der Literatur vorhandenen Angaben konnten, wie in der Einleitung schon erwähnt, im wesentlichen die Oxalsäure, Zitronensäure und die Glukonsäure, event. auch noch die Zuckersäure in Frage kommen. Die Bildung von Oxal- und Zitronensäure durch Schimmelpilze und speziell durch *Aspergillus niger* ist seit langem durch die Untersuchungen von Wehmer, Currie, Mazé, Perrier und Butkewitsch[1]) bekannt, während ihre Fähigkeit, auch Glukonsäure zu bilden, erst in den letzten Jahren durch Molliard (1922, 1924), Falck u. Kapur (1924) und Butkewitsch (1924) entdeckt worden ist. Die Angaben von Challenger, Subramaniam u. Walker (Journ. chem. soc. London, 1927, S. 200), die neuerdings auch Zuckersäure festgestellt haben, bedürfen, wie schon einleitend erwähnt, noch der Bestätigung. Das qualitative und quantitative Verhältnis der Bildung dieser organischen Säuren in *Aspergillus*-Kulturen ist zunächst von der physiologischen Individualität der einzelnen Pilzrassen abhängig. Es gelingt jedoch durch Variation der Kulturbedingungen, dieses Verhältnis nach verschiedenen und oft extremen Richtungen zu verschieben.

Die Bildungsbedingungen für diese einzelnen Säuren sind trotz der vielen Untersuchungen auf diesem Gebiete durchaus noch nicht klargestellt. Im allgemeinen wird die Oxalsäure durch *Aspergillus*-Rassen in verschiedener Quantität auf allen möglichen

1) Angabe der älteren Literatur in Lafar, Handb. d. Techn. Mykologie, Bd. 2, S. 239.

Kohlenstoffquellen, wie Kohlenhydraten, Eiweißsubstanzen, Alkoholen und organischen Säuren, gebildet. Über die optimalen Bildungsbedingungen dieser Säure ist der Literatur zu entnehmen, daß die Oxalsäure sich bei höheren Temperaturen und saurer Reaktion des Nährmediums bei genügend vorhandenem Stickstoff in nur geringen Mengen bildet oder anhäuft. Mit fallender Temperatur wird die Anhäufung unter den gleichen Kulturbedingungen stärker, und Wehmer fand bei etwa 7 ° C ein Optimum. Bei einem Zusatz von Kalziumkarbonat zu dem Nährmedium wird die Oxalsäureausbeute aber bedeutend größer. Eine Abhängigkeit von dem gegebenen Stickstoff fand Butkewitsch (1922) insofern, als *Citromyces*-Arten auf Rohrzuckerlösung mit Kalziumkarbonat bei relativem Stickstoffmangel neben der Zitronensäure auch die Oxalsäure in mehr oder weniger bedeutender Menge anhäuften. Im allgemeinen wird diese Säure als ein Produkt unvollständiger Oxydation organischer Verbindungen angesehen, ohne daß eine genauere Einsicht in den Chemismus auf experimenteller Grundlage erreicht worden sei.

Während die Oxalsäure unter normalen Bedingungen fast immer in mehr oder weniger großen Mengen in *Aspergillus*-Kulturen auftritt, ist die Entstehung der Glukon- und Zitronensäure an verschiedene Faktoren gebunden, wie dies aus den vorhandenen Arbeiten hervorgeht. Diese sind, abgesehen von der Pilzrasse, vor allem die Zusammensetzung der Nährlösung, ihre Reaktion und die Temperatur.

Glukonsäure wurde bis jetzt nur bei Kultur der Pilze auf Glukose, Saccharose und Maltose erhalten (Amelung, 1927; Molliard, 1924). Als optimale Bildungsbedingungen stellte Butkewitsch (1924) niedrige Azidität oder Alkalität, wie sie durch Kalziumkarbonatzusatz gegeben ist, fest. Bernhauer (1926) fand aber auch noch eine Abhängigkeit von der vorhandenen Stickstoffmenge, insofern als bei Gegenwart von Kalziumkarbonat die Glukonsäurebildung durch relativ große Mengen Stickstoff stark gehemmt werden kann. Molliard (1922, 1924) stellte auch eine Beeinflussung der Glukonsäurebildung durch eine Wachstumshemmung des Myzels fest, indem ein Nährsalzmangel ebenfalls die Glukonsäurebildung förderte. Daraus scheint sich zu ergeben, daß das Optimum der Glukonsäurebildung bei niedriger Azidität oder Alkalität der Nährlösung oder einer Wachstumshemmung des Myzels durch Stickstoffhunger bezw. Nährsalzmangel gegeben ist.

Die Zitronensäure wurde bis jetzt nur auf Kohlenstoffverbindungen erhalten, die der Zuckerreihe nahe stehen (vgl. Bernhauer, 1928), wie in der Einleitung schon dargestellt wurde. Allgemein ergab sich schon in früheren Arbeiten von Mazé u. Perrier (Annal. Inst. Pasteur, Bd. 18, 1904, S. 553) und Currie, daß Stickstoffmangel im Nährmedium ein für die Zitronensäurebildung günstiger Faktor ist. Diese Resultate wurden neuerdings von Kostytschew u. Tschechnokov (1927) im Prinzip bestätigt; sie fanden, daß eine wesentliche Zitronensäureproduktion erst dann eintritt, wenn die Stickstoffassimilation des Myzels gehemmt wird oder aufhört. Butkewitsch (1922) und Bernhauer (1926) haben dagegen auch bei relativ reichlichen Stickstoffmengen eine bedeutende Zitronensäureausbeute erhalten; doch haben beide Autoren ebenfalls eine gewisse Abhängigkeit der Zitronensäurebildung von der vorhandenen Stickstoffmenge gefunden. Molliard erhielt in saurer Lösung bei ebenfalls reichlicher Stickstoffgabe, aber Mangel an übrigen Nährsalzen auch erhebliche Mengen von Zitronensäure. Aus seinen weiteren Ergebnissen schloß Butkewitsch (1924), daß es vor allem die Reaktion der Nährlösung sei, die den Verlauf der Säurebildung reguliere, und zwar derart, daß bei niedriger Azidität vornehmlich Glukonsäure und bei höherer Zitronensäure entstehe. Er fand, daß die Zitronensäurebildung bei Gegenwart von Kalziumkarbonat stark gehemmt wurde, ein Resultat, das Kostytschew u. Tschechnokov bestätigen konnten. Diesen Ergebnissen steht nun wiederum die Einschränkung durch Bernhauer gegenüber, daß zwar wohl die Reaktion einen Einfluß hat, daß sie aber nicht als der entscheidende Faktor angesehen werden kann. Bernhauer (1926) fand nämlich trotz Gegenwart von Kalziumkarbonat eine ansehnliche Zitronensäureproduktion, wenn reichlich Stickstoff in der alkalisch reagierenden Lösung vorhanden war. Die Vielgestaltigkeit dieser Ergebnisse wird nun noch weiter durch die von Bernhauer gefundene Abhängigkeit von der Natur der Stickstoffquelle und dem von Kostytschew u. Tschechnokov ermittelten Einfluß der Zuckerkonzentration vermehrt.

Aus diesen der Literatur entnommenen Resultaten ergibt sich, daß die Bildungsbedingungen der Zitronensäure, wie mehr oder weniger auch der übrigen Säuren, durchaus noch nicht geklärt sind, und daß es noch weiterer Untersuchungen bedarf, um einen Einblick in ihren Chemismus zu erhalten. Die schon im ersten Teil der Arbeit gewonnene Erkenntnis, daß der Säurestoffwechsel

durch weitgehenden Stickstoffmangel ganz wesentlich geändert werden kann, ließ die Hoffnung erstehen, durch Verwendung der stickstoffreien Kultur als Methode einen neuen Angriffspunkt für die Lösung des Säureproblems zu gewinnen.

b) Säurebildung in saurer Nährlösung.

Um nun zunächst die unter stickstoffreien Bedingungen gebildeten Säuren qualitativ und quantitativ zu bestimmen, wurden Kulturen von *Aspergillus niger* Tübingen unter den üblichen Bedingungen angesetzt. Die Versuchsreihe 9 zeigte nun gleich ein überraschendes Resultat: Stets wurden in den stickstofffreien Kulturen lediglich Glukon- und Oxalsäure nachgewiesen, niemals aber Zitronensäure. Quantitativ stellte sich diese Säurebildung so dar, daß im Mittel etwa 72 % der verbrauchten Glukose in Glukonsäure übergeführt wurden. Die Höchstmenge an gebildeter Glukonsäure war nach 40 Kulturtagen mit 1,97 g erreicht. Die Oxalsäureproduktion ist erheblich geringer und übersteigt den Wert von 0,6 g nur wenig, was auf den Glukoseverbrauch bezogen etwa 26 % ausmacht. Die Hauptproduktion beider Säuren findet sich in den ersten 24 Tagen der Versuchsdauer in der Zeit, in der ebenfalls das stärkste Myzelwachstum stattfindet. Auffallend ist bei allen Versuchen, daß in den einzelnen Reihen die Ausbeute an Glukonsäure prozentual auf den Glukoseverbrauch bezogen ziemlich konstante Werte ergab, z. B. rund 72 %. In anderen Reihen mit geänderten Kulturbedingungen haben sich andere meist höhere Werte ergeben, die aber ebenfalls eine ähnliche prozentual auf den Glukoseverbrauch bezogene Konstanz aufwiesen. Aus dieser Reihe geht weiter hervor, daß der Pilz unter stickstoffreien Bedingungen seinen Stoffwechsel vollkommen umgestellt haben muß: Nicht nur, daß die Glukonsäure überhaupt gebildet wird, sondern daß sie auch in großen Mengen bei stark saurer Reaktion der Nährlösung auftritt, ist das Neue. Wie sich später noch zeigen wird, bildet *Aspergillus niger* bei geringen Mengen von vorhandenem gebundenem Stickstoff reichlich Zitronensäure, und es ist äußerst bemerkenswert, daß der Pilz unter den Bedingungen erzwungener Luftstickstoffassimilation diese Säure nicht produziert. Die Oxalsäure stellt dagegen auf das Myzelgewicht bezogen einen auffallend hohen Wert dar. Bevor aber eine Erklärung für diese Eigentümlichkeiten des Säurestoffwechsels versucht wird, ist es notwendig, noch darzustellen, wie

er sich unter einer Reihe anderer Bedingungen verhält. In der Versuchsreihe 10 wurden die Kulturen bei einer Temperatur von 30—32° C im Gegensatz zu 20—22° C, sonst aber ebenso wie in der vorhergehenden Reihe erzogen. Obwohl die Glukonsäure in noch weit größeren Mengen gebildet wurde, ist die Höchstazidität von 187,3 ccm und der p_H mit 1,89 (Versuch Nr. 132) eine geringere als in der vorigen Versuchsreihe.

Tabelle 9. Versuchsreihe 9.

Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	121	122	123	124	125	126
Zusammensetzung d. Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	21,50	94,12	171,6	230,3	253,1	241,5
p_H	2,84	2,52	1,80	1,51	1,48	1,49
Kalziumglukonat . g	—	1,102	1,583	2,106	2,257	1,994
Glukonsäure . . . g	0,107 [1])	0,964	1,385	1,843	1,975	1,744
Kalziumoxalat . . g	0,064	0,261	0,627	0,898	1,002	1,036
Oxalsäure . . . g	0,039	0,161	0,386	0,553	0,617	0,638
Glukose . . . . g	4,48	3,89	3,12	2,87	2,68	2,73
Glukoseverbrauch . g	0,52	1,11	1,88	2,13	2,32	2,27
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	20,5	86,8	73,6	86,5	85,1	76,8
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	7,5	14,5	25,3	25,9	26,5	28,1
Myzelgewicht . . mg	11,87	28,25	43,99	59,23	68,56	74,21
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	0,66	1,13	2,08	2,55	2,77	2,71
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzelgewicht . . .	1,20	1,18	1,41	1,04	1,10	0,90
Stickstoffgehalt der Lösung mg	0,52	0,80	1,45	2,07	2,01	2,04

Diese Differenzen kommen dadurch zustande, daß weniger Oxalsäure vorhanden ist, die sowohl die potentielle als auch die aktuelle Azidität entscheidend beeinflußt. Die Ausbeute an Glukonsäure, in Prozenten auf den Glukoseverbrauch bezogen, beträgt

1) Aus der Azidität berechnet.

rund 77% und ist somit um weniges höher als in den Kulturversuchen bei 20—22° C. Bei der Beurteilung dieses Wertes ist zu beachten, daß die Steigerung des prozentualen Wertes bei der Steigerung der beiden absoluten Werte — Glukoseverbrauch und Glukonsäurebildung — anzuzeigen scheint, daß es sich hier nicht nur um eine Steigerung des Gesamtprozesses, sondern auch um eine Verschiebung des Gleichgewichtes handelt. Selbst bei stark

Tabelle 10. Versuchsreihe 10.

Temperatur: 30—32° C.

Versuch Nr.	127	128	129	130	131	132
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O.					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	39,05	56,57	152,2	157,1	187,3	164,8
p_H	3,21	2,92	2,27	2,15	1,89	2,04
Kalziumglukonat g best.	0,514	1,627	verunglückt	3,001	2,845	2,958
Kalziumglukonat g ber.	0,613	1,818	2,969	3,243	3,401	3,267
Glukonsäure g berechnet	0,536	1,590	2,597	2,837	2,975	2,858
Kalziumoxalat . . . g	Spuren	0,057	0,090	0,036	0,202	0,087
Oxalsäure . . . . g	„	0,035	0,056	0,022	0,126	0,052
Glukose . . . . . g	4,23	3,18	1,98	1,43	0,99	1,02
Glukoseverbrauch . . g	0,77	1,82	3,12	3,57	4,01	3,98
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	69,6	87,3	83,2	79,4	74,2	71,8
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	1,9	1,7	0,6	3,1	1,3
Myzeltrockengewicht mg	19,26	34,93	72,00	102,50	136,19	144,92
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	0,82	1,49	3,10	3,60	3,87	3,79
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzelgewicht	1,35	0,98	1,29	0,89	1,16	0,93
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	0,56	1,15	2,17	2,67	3,28	2,43

saurer Reaktion des Nährmediums zeigt sich, daß mit abnehmender Azidität mehr Glukonsäure gebildet wird, wie es auch in weniger extremen Verhältnissen und in ganz anderen p_H-Bereichen von Butkewitsch bereits festgestellt worden ist. Die von der Tem-

peratur abhängigen quantitativen Differenzen in der vorhandenen Oxalsäure sind ohne Zweifel wie in den normalen Kulturen durch das stärkere Oxydationsvermögen bei höherer Temperatur bedingt. Zitronensäure ließ sich auch in dieser Reihe bei einer Temperatur, die in stickstoffhaltigen Kulturen etwa die maximale für ihre Bildung ist, nicht nachweisen.

Kostytschew u. Tschechnokov hatten festgestellt, daß in Nährlösungen mit 5% Zucker kaum oder nur wenig Zitronensäure gebildet wird; daher wurde die nächste Kulturreihe mit 15% Glukoselösung angestellt, deren Ergebnisse in der Tabelle 11 zusammengestellt sind. Die Säureproduktion ist unter dieser Bedingung kaum von den Kulturen mit nur 5% Glukoselösung verschieden. Ebenso ist die Glukonsäureausbeute kaum etwas höher, während die Oxalsäuremengen noch um Weniges geringer sind. Dies dürfte

Tabelle 11. Versuchsreihe 11.

Temperatur: 30—32° C.

Versuch Nr.	133	134	135	136	137	138
Zusammensetzung der Nährlösung	15,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O.					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	50,24	96,37	163,2	166,7	180,7	193,0
p_H	3,28	2,95	2,09	2,19	1,85	1,78
Kalziumglukonat . . g	0,752	1,932	3,174	3,457	3,481	3,535
Glukonsäure . . . . g	0,658	1,690	2,777	3,024	3,040	3,093
Kalziumoxalat . . . g	Spuren	Spuren	0,099	Spuren	0,115	0,168
Oxalsäure . . . . g	„	„	0,061	„	0,071	0,105
Glukose . . . . . g	14,08	13,05	11,42	11,01	10,58	10,63
Glukoseverbrauch . . g	0,92	1,95	3,38	3,99	4,42	4,37
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	71,5	86,6	82,1	77,5	86,7	70,7
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	—	1,82	—	1,63	2,40
Myzeltrockengewicht mg	18,47	39,34	81,43	114,0	138,92	131,60
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	0,84	1,67	3,35	3,67	3,94	3,83
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzelgewicht	1,45	1,05	1,38	0,97	1,10	0,94
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	0,57	1,26	2,20	2,57	2,40	2,61

jedoch durch die Temperaturschwankungen im Thermostaten zwischen 30—32° C bedingt sein, da sich in der Tat ergeben hat, daß Temperaturdifferenzen in diesem Maße die Oxalsäureanhäufung schon merklich beeinflussen.

Wiederum bemerkenswert ist es nun, daß auch bei dieser höheren Glukosekonzentration keinerlei Zitronensäure nachweisbar war. Es konnte nun noch die Möglichkeit bestehen, daß unter diesen abnormen Bedingungen auch noch bei vorhandener Glukose infolge schnellen Wiederverbrauches der etwa gebildeten Zitronensäure diese dem Nachweis entgeht. Um diese Frage zu klären, wurden acht Kulturen von vornherein 0,1 g kristallisierte Zitronensäure zugegeben, und dann je zwei Kulturen nach 8, 16, 24 und 40 Tagen analysiert. Durch die Zugabe dieser Säure war natürlich infolge der Reaktionsveränderung eine Beeinträchtigung des Stoffwechsels zu erwarten; der Anfangs-pH der Nährlösungen mit 0,2 g Zitronensäure betrug 3,02. Tatsächlich kam dies sowohl in der verringerten Myzelernte als auch im Verlauf der Säurebildung zum Ausdruck: Obwohl der Glukoseverbrauch nur wenig von den unter sonst analogen Bedingungen angestellten Kulturreihen abweicht, ist die vorhandene Glukonsäuremenge absolut, wie auch prozentual erheblich geringer, während die Oxalsäure zugenommen hat. Von besonderer Bedeutung ist aber, daß ein Verbrauch der zugegebenen Zitronensäure nicht festzustellen war. Die Differenzen in der zugegebenen und wiedergefundenen Menge dieser Säure fallen zweifellos in die Fehlergrenze dieser quantitativen Bestimmungs- und Trennungsmethoden. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in der Tabelle 12 zusammengestellt.

Um den Einfluß der dem Pilze zur Verfügung stehenden Sauerstoffmengen, überhaupt den Einfluß der Durchlüftung der Kulturen zu studieren, wurden die nächsten Versuche unternommen. Wie aus dem methodischen Teil zu ersehen ist, wurde gewöhnlich durch die Versuchsreihen vorher gereinigte Luft mittels der Wasserstrahlpumpe gesaugt. In diesen Versuchen wurde dagegen ein Gemisch von 50 Volumteilen Luft und ebensoviel Sauerstoff aus dem Gasometer durch die Kulturgefäße gedrückt. Um den Gasaustausch dieser Kulturen wenigstens annäherungsweise dem der übrigen anzugleichen, wurde dafür gesorgt, daß in beiden Fällen etwa die gleiche Anzahl Gasblasen pro Minute durch die Nährlösungen hindurchtrat. Während infolge der als Sperrflüssigkeit wirkenden Nährlösung beim Durchsaugen der Luft in den einzelnen

Tabelle 12. Versuchsreihe 12. Temperatur: 30—32° C.

Versuchs-Nr.	139	140	Mittel	141	142	Mittel	143	144	Mittel	145	146	Mittel
Zusammensetzung der Nährlösung	15,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 0,1 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ zu 100 ccm H_2O											
Kulturdauer . . . Tage	8	8	**8**	16	16	**16**	24	24	**24**	40	40	**40**
Azidität . . . . . ccm	46,52	51,14	**48,83**	96,18	92,25	**94,21**	126,0	142,7	**134,3**	147,9	157,4	**152,6**
p_H	2,79	2,86	**2,82**	2,51	2,72	**2,61**	2,07	2,15	**2,11**	1,94	1,88	**1,91**
Kalziumglukonat . . g	0,488	0,591	**0,530**	1,185	1,201	**1,193**	1,911	2,224	**2,067**	2,136	2,371	**2,253**
Glukonsäure . . . g	0,427	0,511	**0,469**	1,037	1,051	**1,044**	1,672	1,991	**1,831**	1,912	2,122	**2,017**
Kalziumzitrat . . . g	0,128	0,107	**0,118**	0,099	0,111	**0,100**	0,117	0,130	**0,112**	0,086	0,105	**0,090**
Zitronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) . g	0,108	0,090	**0,099**	0,083	0,093	**0,088**	0,098	0,109	**0,104**	0,072	0,088	**0,080**
Kalziumoxalat . . . g	Spuren	—	—	0,104	0,079	**0,091**	0,124	0,100	**0,112**	0,178	0,190	**0,184**
Oxalsäure . . . . g	„	—	—	0,064	0,048	**0,056**	0,076	0,061	**0,069**	0,109	0,117	**0,114**
Glukose . . . . . g	14,10	14,21	**14,15**	12,98	12,69	**12,83**	11,22	11,04	**11,13**	10,84	11,01	**10,92**
Glukoseverbrauch . . g	0,90	0,79	**0,84**	2,02	2,31	**2,16**	3,78	3,96	**3,87**	4,16	3,99	**4,07**
Ausbeute an Glukonsäure in % bez. a. d. Glukoseverbrauch	47,4	64,6	**56,0**	51,3	45,4	**50,3**	44,2	50,2	**47,2**	45,9	53,1	**49,5**
Ausbeute an Oxalsäure in % bez. a. d. Glukoseverbrauch	—	—	—	3,2	2,1	**2,6**	2,0	1,5	**1,7**	2,6	2,9	**2,7**
Myzeltrockengewicht . mg	16,73	13,94	**15,33**	28,77	33,01	**30,89**	71,43	75,00	**73,21**	114,28	103,91	**109,09**

Gefäßen ein gewisser Unterdruck herrschte, stellte sich in diesen Versuchen bei der Durchleitung des Gasgemisches ein entsprechender Überdruck ein. Die Analyse dieser 12 Kulturen ergab gegenüber den anderen unveränderte Werte und somit keinerlei Einfluß einer größeren Sauerstoffkonzentration, so daß auf eingehendere Darstellung verzichtet werden kann.

Zusammenfassend hat sich also ergeben, daß in *Aspergillus*-Kulturen ohne gebundenen Stickstoff bei saurer Reaktion der Nährlösung Glukon- und Oxalsäure gebildet werden. Die Bildung dieser Säuren ist, auf die Myzelgewichte bezogen, gegen Kulturen mit gebundenem Stickstoff außerordentlich erhöht. Die in stickstoffhaltigen Kulturen von Butkewitsch festgestellte Abhängigkeit der Glukonsäurebildung von der Reaktion der Nährlösung — nämlich, daß sie nur bei alkalischer oder schwachsaurer Reaktion gebildet werde — trifft unter diesen Bedingungen nicht zu. Allerdings ist eine gewisse Tendenz zur Steigerung der Glukonsäureausbeute mit steigendem p_H zu erkennen. Die in der Nährlösung vorhandene Oxalsäuremenge ist in den bei 20—22° gezogenen Kulturen außerordentlich hoch, was um so auffälliger wird, wenn man einer vergleichenden Betrachtung die Myzelgewichte unterlegt. Bei einer Temperaturerhöhung um 10° sinkt die Oxalsäureausbeute erheblich. Zitronensäure wurde in keiner Kultur gefunden, und außerdem ließ sich nachweisen, daß diese Säure nicht etwa sekundär wieder verbraucht worden ist, sondern tatsächlich nicht gebildet wurde. Eine Veränderung der Glukosekonzentration der Nährlösung verändert den Gesamtstoffwechsel weder qualitativ noch quantitativ. Ebensowenig hat sich irgend ein Einfluß einer höheren Sauerstoffkonzentration ergeben.

c) Säurebildung in kalziumkarbonathaltigen Nährlösungen.

Aus dem ersten Teil dieser Arbeit war ersichtlich, daß ein Zusatz von Kalziumkarbonat zu den Nährlösungen die Myzelernte und die Luftstickstoffassimilation im Endeffekt gesteigert hat. Dieser Erfolg ist möglicherweise nur durch das Abfangen der Säuren bedingt worden; die Möglichkeit jedoch, daß durch den Karbonatzusatz auch eine Veränderung im Ablauf des Säurestoffwechsels erfolgt, machte die Untersuchung der Säureproduktion in solchen Kulturen mit alkalischen Anfangsreaktionen notwendig, zumal alle anderen Autoren einen großen Teil ihrer Resultate auf derartige Kulturen bezogen haben.

Die ersten Versuchsreihen erhielten einen Zusatz von 0,5 g Kalziumkarbonat und gelangten wiederum bei 20—22° und 30 bis 32° C zur Durchführung. Die Resultate der ersten Kulturreihe sind in der Tabelle 13 zusammengestellt und zeigen bei dem Vergleich mit den karbonatfreien Kulturen die auffallende Hemmung des Myzelwachstums, auf die schon früher bei der Besprechung der Stickstoffassimilation hingewiesen wurde, solange die Nährlösung alkalisch reagiert. Mit der Reaktionsänderung setzt dann plötzlich ein stärkeres Myzelwachstum ein, das nun auch eine Änderung der Säureproduktion auslöst. Die in der Tabelle 13 zusammengestellten Analysenresultate zeigen, daß zwar die Glukonsäurebildung den gleichen Anfangsverlauf hat wie in karbonatfreien Kulturen, aber im Endeffekt dann doch höhere Werte ergibt. Die auf den Glukoseverbrauch bezogene prozentuale Ausbeute ist, so-

Tabelle 13. Versuchsreihe 13.

Temperatur: 20—22 ° C.

Versuch Nr.	147	148	149	150	151	152
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,001 $FeCl_3$, 0,5 $CaCO_3$, 0,02 $MgSO_4$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . . ccm	—	—	—	24,12	197,2	225,6
p_H	—	7,48	7,25	3,79	1,65	1,52
Kalziumglukonat . . . . g	—	0,591	1,181	1,799	2,548	2,355
Glukonsäure . . . . . g	—	0,517	1,033	1,574	2,229	2,057
Kalziumoxalat . . . . g	—	0,072	0,131	0,233	1,277	1,521
Oxalsäure . . . . . g	—	0,045	0,085	0,144	0,787	0,937
Glukose . . . . . g	—	4,30	3,61	2,83	1,49	1,51
Glukoseverbrauch . . . g	—	0,70	1,39	2,17	3,15	3,49
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch	—	73,8	74,3	72,5	63,5	58,9
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch	—	6,3	6,1	6,6	22,4	26,8
Myzeltrockengewicht . mg	—	17,00	33,14	50,08	98,53	113,95
Gesamtstickstoffassimilation . . . mg	—	0,73	1,09	1,44	3,01	3,15
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzelgewicht	—	0,93	1,05	0,90	1,05	0,96
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . . mg	—	0,62	0,74	0,99	1,97	2,14

lange alkalische Reaktion im Nährmedium herrscht, höher als in karbonatfreien Kulturen, erreicht aber andererseits nicht die Werte der karbonatfreien Kulturen bei höherer Temperatur. Nach erfolgter Reaktionsänderung sinken diese Werte etwas, eine Veränderung, die aber überraschend gering ist. Dies bestätigt die bereits ausgesprochene Auffassung, daß die Glukonsäurebildung nicht direkt von äußeren Bedingungen, sondern hauptsächlich von dem Energiebedarf des Pilzes abhängig ist. So nur allein erklärt sich auch, daß bei einem p_H-Sprung nach Verbrauch des zugegebenen Karbonats die Glukonsäureproduktion eine so geringe Änderung erfährt. Wohl wird hier das Myzelwachstum erheblich stärker, aber der Pilz gelangt nun in saurer Lösung unter günstigere Bedingungen, wodurch wohl die Energieverhältnisse ausgeglichen

Tabelle 14. Versuchsreihe 14.
Temperatur: 30—32 ° C.

Versuch Nr.	153	154	155	156	157	158
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 0,5 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	117,2	158,2	174,5	187,6
p_H	7,62	7,65	2,71	2,67	2,52	2,04
Kalziumglukonat . . g	—	1,027	2,396	4,472	3,768	3,613
Glukonsäure . . . . g	0,190[1])	0,898	2,096	3,037	3,296	3,161
Kalziumoxalat . . . g	Spuren	0,094	0,696	0,752	0,719	0,825
Oxalsäure . . . . g	„	0,058	0,429	0,463	0,443	0,508
Glukose . . . . . g	4,73	4,01	2,30	1,41	1,24	0,87
Glukoseverbrauch . . g	0,27	0,99	0,27	3,59	3,76	4,13
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	90,72	77,64	84,61	87,6	76,5
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	5,8	15,8	12,9	11,8	12,3
Myzeltrockengewicht mg	15,76	24,90	83,55	127,49	144,40	162,94
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	0,66	0,99	2,50	3,11	3,49	4,01
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen anf das Myzelgewicht. . . .	1,14	1,09	1,27	1,11	1,02	0,95
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	0,48	0,72	1,44	1,69	2,01	2,50

1) Aus dem CaO-Gehalt der Nährlösung berechnet.

werden. An diesem Ausgleich mag sich weiterhin auch die erhöhte Oxalsäureproduktion beteiligen.

Eben diese veränderte Oxalsäureproduktion ist es, die nun ganz besonderes Interesse beansprucht. Vergleicht man die Resultate der Versuchsreihe 9, also karbonatfreie Nährlösungen mit diesen karbonathaltigen, so zeigt sich, daß dort bei einem Myzel von 59 mg 0,553 g Oxalsäure vorhanden waren, während in der karbonathaltigen Lösung (Tab. 13) bei einem Myzel von 50 mg unverhältnismäßig viel weniger, nämlich 0,143 g, produziert wurden. Es wird also in karbonathaltigen Kulturen unter diesen Bedingungen zunächst bedeutend weniger Oxalsäure gebildet als in karbonatfreien[1]).

Während nun die Oxalsäuremenge, solange Karbonat vorhanden ist, sich etwa im Verhältnis von 1 : 2,8 mit dem Myzelgewicht erhöht, erfolgt die Erhöhung nach dem p_H-Sprung plötzlich in einem solchen von 1 : 8,0. In der Versuchsreihe 15 kommt diese nach erfolgter Säuerung der Nährlösung eintretende, stark erhöhte Oxalsäureproduktion besser zum Ausdruck, weil die absoluten Werte hier erhöht sind. Während in den vorhergehenden Reihen den Kulturen je 0,5 g Kalziumkarbonat zugefügt wurde, betrug der Zusatz in der Kulturreihe 15 je 1,0 g. Das hatte den Erfolg, daß das Myzelwachstum hier erst später sistiert wurde, weil infolge der länger andauernden Neutralisation die Oxalsäure, die im wesentlichen die stark saure Reaktion bedingt, auch erst später frei wurde. Der nach der Reaktionsänderung erfolgte Myzelzuwachs von 85 mg

---

1) Dieses Versuchsresultat würde der Ansicht, daß disponible Basen durch ihre Reizwirkung die Oxalsäureproduktion induzieren, widersprechen. Wetzel (1927) sieht in dieser Auffassung „den Grundgedanken von Wehmer, Pfeffer, Benecke“ und leitet ihn aus Wehmers Gleichsetzung der beiden Prozesse „Entstehung und Erhaltung der Säure“ ab. Wehmer drückt sich stets sehr vorsichtig aus, insofern er doch immer wieder betont, daß irgendwie vorhandene Basen die Säure nur abfangen, die als intermediäres Stoffwechselprodukt entstanden ist. Besonders deutlich wird das aus folgenden Worten (Bot. Ztg., S. 251, 891): „Es regulieren Basen — mögen sie nun durch Konsum der mit ihnen verbundenen nutzbaren Säuren disponibel oder künstlich zugeführt werden — die faktische Säureentstehung — wenigstens in dem Sinne, als sie einen Teil der Oxalsäure der weiteren Zersetzung dauernd oder temporär entziehen —, d. h. sie geben Veranlassung nicht zur Entstehung, sondern zur Bindung und damit Erhaltung derselben, wie sich dies für *Aspergillus* insbesondere klar zeigen läßt“. Trotz alledem ist aber, wie Wetzel schon betonte, die Vorstellung von der Basenreizwirkung in einer Reihe von Arbeiten, wenn auch verschleiert, enthalten. Diese ist nun angesichts meiner oben dargestellten Resultate völlig unhaltbar.

und die höhere Myzelernte von etwa 40 mg gegen die vorhergehende Reihe bei derselben Temperatur (Tab. 13) beleuchten das oben Gesagte deutlich. Die Differenz in den Oxalsäuremengen vor und nach der Reaktionsänderung (siehe Versuche 163 und 164) betragen hier 0,86 g.

Diesen Versuchen mit Kalziumkarbonatzugaben ist das wichtige Ergebnis zu entnehmen, daß unter den eingehaltenen Bedingungen das Optimum der Oxalsäurebildung bei saurer Reaktion der Nährlösung liegt. Daß Oxalsäure in großen Mengen auch in Kulturen mit überschüssigem Karbonat entsteht, ist wohl so zu erklären, daß sich freie Säure in der oberen Schicht des Nährmediums trotz Gegenwart von Kalziumkarbonat anhäuft oder zum mindesten immer in unmittelbarer Nähe der Hyphen eine saure Reaktion erzeugt.

In den Untersuchungen anderer Autoren bleibt es zweifelhaft, ob die festgestellten Säuremengen auch den tatsächlich gebildeten entsprochen haben. Die hier verwendeten stickstoffreien Kulturbedingungen ließen aber einen sehr viel besseren Einblick in das Verhältnis der gebildeten zur angehäuften Säuremenge zu. Es ist fraglos, daß in sauren wie auch in den mit Kalziumkarbonat versetzten Kulturen ein gewisser Teil der gebildeten Oxalsäure durch raschen Wiederverbrauch sich dem Nachweis entziehen kann. Da aber in den karbonathaltigen Kulturen unter diesen Bedingungen sehr bald eine große Menge von gelöstem Kalziumglukonat vorhanden ist, das jederzeit mit etwa gebildeter Oxalsäure leicht in Reaktion treten kann, ist ein Verlust durch sofortige Weiterverarbeitung nicht sehr wahrscheinlich. Durch die langsame Myzelentwicklung bei dem gehemmten Wachstum meiner Kulturen und der damit verbundenen zeitlichen Auseinanderziehung der unter normaleren Bedingungen überaus rasch verlaufenden Reaktionen ist es möglich, den immerhin einige Zeit andauernden Zustand zu verwirklichen, nämlich die bei verhältnismäßig geringer Azidität produzierte Oxalsäure festzulegen.

Die Glukonsäureproduktion verläuft in diesen Kulturen mit 1,0 g Kalziumkarbonat nahezu wie in den mit 0,5 g, doch ist die erreichte Ausbeute nach 48tägiger Kulturdauer bei der bei 20 bis 22° C aufgestellten Reihe höher. Erhöht man aber die Temperatur, wie dies in den Versuchsreihen 14 und 16 geschehen ist, auf 30 bis 32° C, so wird die Glukonsäureproduktion noch erheblich gesteigert; in der einen Kulturreihe 16 ist freilich ein Teil davon nach völliger

Aufzehrung der Glukose wiederverbraucht worden. Da die gebildeten Glukonsäuremengen höher sind, erfolgten die Reaktionsänderung und die damit erhöhte Oxalsäureproduktion ebenfalls früher; doch wird von dieser Säure nicht viel mehr angehäuft, als durch das vorhandene Kalzium gebunden werden kann. Dies entspricht durchaus den Resultaten in sauren Kulturen bei höherer Temperatur. Sehr deutlich ergibt sich wiederum aus den Analysenresultaten die weitgehende Unabhängigkeit der Glukonsäurebildung von der Reaktion und die Konstanz ihrer prozentualen Ausbeute. Desgleichen zeigt sich deutlich, daß die Hemmung der Myzelentwicklung durch die Alkalität bei höherer Temperatur leichter überwunden wird.

Die nächsten Versuchsreihen sollten unter denselben Bedingungen nun auch noch den etwaigen Einfluß einer höheren

Tabelle 15. Versuchsreihe 15.

Temperatur: 20—22 ° C.

Versuch Nr.	159	160	161	162	163	164
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	—	287,4
p_H	—	7,41	7,42	7,48	7,39	1,85
Kalziumglukonat . . g	—	verunglückt	1,217	1,950	3,001	4,728
Glukonsäure . . . . g	—	„	1,065	1,709	2,625	4,137
Kalziumoxalat . . . g	—	0,062	0,110	0,217	0,397	1,792
Oxalsäure . . . . . g	—	0,038	0,069	0,134	0,245	1,104
Glukose . . . . . g	—	4,38	3,70	2,72	1,72	—
Glukoseverbrauch . . g	—	0,62	1,30	2,28	3,28	5,00
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	—	81,9	74,9	80,0	82,7
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	6,1	5,3	5,9	7,4	23,9
Myzeltrockengewicht mg	—	14,19	27,89	48,45	64,93	148,11
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,74	1,17	1,43	2,45	4,20
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzelgewicht	—	1,00	1,10	1,04	1,07	0,96
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,60	0,87	0,93	1,75	2,78

Glukosekonzentration anzeigen; so wurde in den Versuchsreihen 17 und 18 der Glukosegehalt auf 10 % und in der nächsten Reihe 19 auf 15 % erhöht. Aus der Tabelle 16 ergibt sich schon, daß erst nach völligem Glukoseverbrauch die Glukonsäure in weiterem Maße von dem Pilz abgebaut wird. In diesen drei weiteren Reihen mit höheren Glukosekonzentrationen tritt dieses Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Glukonsäurebildung deutlich hervor, indem sich zeigte, daß bei Vorhandensein einer genügenden Menge von Glukose die produzierte Glukonsäure den hohen Wert von rund 5,0 g erreichte. Im übrigen stimmen die Resultate mit denjenigen der vorhergehenden Untersuchungen überein; die Versuche mit höheren Zuckermengen ergaben somit wiederum keinen bemerkenswerten Einfluß auf den Säurestoffwechsel.

Tabelle 16. Versuchsreihe 16.
Temperatur: 30—32 ° C.

Versuch Nr.	165	166	167	168	169	170
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	157,7	155,4
p_H	7,58	7,63	7,42	7,31	2,31	2,09
Kalziumglukonat . . g	0,306	1,154	2,715	3,745	3,598	3,039
Glukonsäure . . . . g	0,268	1,009	2,375	3,276	3,148	2,659
Kalziumoxalat . . . g	Spuren	0,071	0,102	0,180	1,371	1,500
Oxalsäure . . . . g	„	0,038	0,063	0,111	0,844	0,924
Glukose . . . . . g	4,58	3,78	2,48	0,84	—	—
Glukoseverbrauch . . g	0,42	1,22	2,52	4,16	5,00	5,00
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .		82,7	94,2	78,7	62,9	53,1
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .		3,0	2,5	2,6	16,8	14,9
Myzeltrockengewicht mg	15,90	27,10	39,00	54,43	122,10	160,04
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	1,03	1,16	1,62	3,17	3,79
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzeltrockengewicht .	—	1,09	0,78	0,77	1,16	0,95
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,74	0,85	1,20	1,66	2,28

Tabelle 17. Versuchsreihe 17.

Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	171	172	173	174	175	176
Zusammensetzung der Nährlösung	10,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	—	249,7
p_H	—	7,44	7,26	7,37	7,21	1,98
Kalziumglukonat . g	—	0,537[1])	1,299[1])	2,075[1])	3,420[1])	4,943[1])
Glukonsäure . . . g	—	0,470[1])	1,114[1])	1,815[1])	2,992[1])	4,324[1])
Kalziumoxalat . . g	—	0,075	0,097	0,154	verunglückt	1,579
Oxalsäure . . . g	—	0,046	0,060	0,097	desgl.	0,974
Glukose . . . . g	—	9,44	8,68	7,82	6,63	4,75
Glukoseverbrauch . g	—	0,56	1,32	2,18	3,37	5,25
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	83,9	86,1	83,8	88,7	82,4
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	8,2	4,6	4,3	—	18,5
Myzeltrockengewicht mg	—	16,01	31,42	46,13	68,90	166,06
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,13	1,05	1,02	1,10	1,03
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,55	0,90	1,25	1,59	2,44
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,73	1,23	1,72	2,35	4,15

Zusammenfassend kann über die mit Kalziumkarbonat versetzten Kulturen folgendes gesagt werden: Die Glukonsäurebildung ist weitgehend unabhängig von der Reaktion der Nährlösung; der Verlauf ihrer Produktion ist abhängig vom Myzelwachstum und von der Temperatur. Da das Myzelwachstum in den mit Kalziumkarbonat versetzten Kulturen durch die zeitweise erreichte $H^{\cdot}$-Konzentration höher ist als in den von Anfang an sauren Kulturen, so sind die absoluten Werte der gebildeten Glukonsäure ebenfalls höher.

Die Glukosekonzentration ist lediglich von quantitativem Einfluß auf die Säurebildung, indem die Glukonsäureproduktion größer

1) Aus dem CaO-Gehalt der Nährlösung berechnet.

Tabelle 18. Versuchsreihe 18.

Temperatur: 30—32° C.

Versuch Nr.	177	178	179	180	181	182
Zusammensetzung der Nährlösung	10,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	243,3	280,8
p_H	7,49	7,47	7,61	7,19	2,16	1,90
Kalziumglukonat . g	?	0,750	2,733	4,166	4,807	5,441
Glukonsäure . . . g	?	0,656	2,394	3,645	4,206	4,760
Kalziumoxalat . . g	Spuren	0,063	0,122	0,197	1,416	1,640
Oxalsäure . . . g	„	0,031	0,075	0,121	0,872	1,010
Glukose . . . . g	?	9,17	7,20	5,52	4,61	3,74
Glukoseverbrauch . g	?	0,83	2,80	4,48	5,39	6,26
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	79,1	84,7	81,3	78,0	76,0
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	3,7	2,6	2,7	16,2	16,1
Myzeltrockengewicht mg	13,54	31,81	42,06	57,19	137,12	171,87
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	1,06	1,29	1,66	3,21	4,02
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzeltrockengewicht .	—	0,88	1,11	0,97	1,07	1,02
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,78	0,75	1,11	1,73	2,27

ist. Es hat sich zeigen lassen, daß das Verhältnis von verbrauchter Glukose zu gebildeter Glukonsäure in seinem Gleichgewicht so lange nicht gestört wird, als eben noch Glukose vorhanden ist.

Die Oxalsäurebildung ist dagegen in den mit Karbonat versetzten Kulturen weitaus geringer, solange Kalziumkarbonat vorhanden ist, bezw. solange die $H^{\cdot}$-Konzentration der Nährlösung auf der alkalischen Seite liegt. Nach der Absättigung des Karbonats durch die gebildeten Säuren und der dabei erfolgenden Reaktionsänderung setzt aber plötzlich eine stark vermehrte Oxalsäurebildung ein. Das Verhältnis des Myzelgewichtes zur gebildeten Oxalsäure wird bei diesem p_H-Sprung mehr als verdreifacht. Zitronensäure war in sämtlichen Kulturreihen nicht nachzuweisen.

Tabelle 19. Versuchsreihe 19.

Temperatur: 30—32° C.

Versuch Nr.	183	184	185	186	187	188
Zusammensetzung der Nährlösung	15,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	infiziert mit Bakterien	284,9
p_H	—	7,19	7,41	6,88		1,93
Kalziumglukonat . g	—	1,004[1])	2,591[1])	3,879[1])		5,677
Glukonsäure . . . g	—	0,878[1])	2,267[1])	3,394[1])		4,967
Kalziumoxalat . . g	—	0,049	0,143	0,172		1,610
Oxalsäure . . . g	—	0,030	0,088	0,106		0,992
Glukose . . . . g	—	13,81	12,37	10,79		8,91
Glukoseverbrauch . g	—	1,19	2,63	4,21		6,09
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	73,8	86,2	80,6		81,6
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	2,5	3,3	2,5		16,3
Myzeltrockengewicht mg	—	29,71	40,55	52,00		178,60
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,03	1,12	1,01		1,03
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,72	0,87	1,02		2,43
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	1,02	1,32	1,54		4,28

d) Säurebildung und Rassenfrage in Normalkulturen.

In Vorversuchen hatte sich ergeben, daß *Aspergillus niger* Tübingen ein starker Zitronensäurebildner ist; darum war es um so unerklärlicher, daß die Zitronensäure unter den bisher eingehaltenen Kulturbedingungen noch nicht einmal in Spuren nachgewiesen werden konnte. Die folgenden Untersuchungen sollten nun dieses Verhalten des Pilzes klären. Die ersten Versuche dienten dazu, die für die Zitronensäurebildung optimalen Bedingungen des Tübinger Pilzes festzustellen. Die Resultate und die angewandten Kulturbedingungen sind in den Tabellen 20 und 21 zusammengestellt.

1) Aus dem CaO-Gehalt der Nährlösung berechnet.

Tabelle 20. Versuchsreihe 20.

Temperatur: 30—32° C.

Kulturdauer	Tage	8	8	8
Versuch Nr.		189	190	191
Zusammensetzung der Nährlösung		10,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O		
Stickstoffzusatz in Form von Ammoniumtartrat	mg	100	30	10
Kalziumzitrat	g	0,412	2,458	0,939
Zitronensäure	g	0,318	1,894	0,723
Glukose	g	5,68	5,39	8,07
Glukoseverbrauch	g	4,32	4,61	1,93

Tabelle 21. Versuchsreihe 21.

Temperatur: 30—32° C.

Kulturdauer	Tage	8	8	8
Versuch Nr.		192	193	194
Zusammensetzung der Nährlösung		10,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O		
Stickstoffzusatz in Form von Ammoniumnitrat	mg	100	30	10
Kalziumzitrat	g	—	1,661	0,511
Zitronensäure	g	—	1,280	0,394
Glukose	g	5,77	5,14	7,68
Glukoseverbrauch	g	4,23	4,86	2,32

Der Vergleich der Resultate ergibt auffällige Differenzen in der Wirkung der einzelnen Stickstoffquellen, wie sie auch von anderen Autoren schon gefunden wurden; auf sie soll hier nicht näher eingegangen werden. Nur scheint mir keine direkte Wirkung des den Stickstoff tragenden Anteiles, also der Anionen $C_4H_4O_6''$ und NO_3', vorzuliegen, da die davon vorhandenen Mengen doch relativ gering sind. Bei der Zugabe einer solchen geringen Menge von Ammoniumnitrat wird außerdem der NO_3-Rest selbst assimiliert, so daß ein Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration kaum in Frage kommen dürfte. Es liegt daher näher, eine Wirkung auf die Assimilierbarkeit des Stickstoffes durch die Anionen anzunehmen.

Weiter ist aus den Tabellen ersichtlich, daß die höchste Zitronensäuremenge bei 8tägiger Versuchsdauer bei einem Stickstoffzusatz von 30 mg in Form von Ammoniumtartrat erhalten

wurde. Es zeigte sich also ein Abhängigkeitsverhältnis der Zitronensäurebildung von der Stickstoffernährung, wie es bereits von anderen Autoren schon festgestellt wurde: nämlich, daß bei relativem Stickstoffmangel die Zitronensäureproduktion gefördert wird. Unter solchen Bedingungen waren also die Versuche anzusetzen, die einen Einblick in die Frage der Zitronensäureproduktion verschaffen sollten. Gleichzeitig damit wurde noch ein anderes Problem aufgerollt, nämlich die Frage der physiologischen Rassen. Ich hatte schon im ersten Teil der Arbeit eine Reihe verschiedener *Aspergillus*-Stämme auf ihre Fähigkeit, atmosphärischen Stickstoff zu binden, untersucht und gefunden, daß dies die einzelnen Stämme in verschiedenem Maße vermögen. Dort ging schon weiter aus den Bestimmungen der Gesamtaziditäten und der p_H-Werte hervor, daß der Säurestoffwechsel dieser Rassen ebenfalls Differenzen aufweisen muß. So soll nun hier auch das Säurebildungsvermögen dieser Stämme untersucht werden, da ja die Rassenverschiedenheit schon seit längerer Zeit eine nicht unbedeutende Rolle bei ähnlichen Untersuchungen gespielt hat. Die eingehende Betrachtung lehrt, daß man es hier mit einem Problem von großer Tragweite zu tun hat. Es sind faktisch seit den fundamentalen Untersuchungen Wehmers wohl kaum zwei Arbeiten über den Säurestoffwechsel von *Aspergillus* gemacht worden, in denen der gleiche Pilzstamm als Untersuchungsobjekt verwendet wurde. Wenn dies doch einmal der Fall war, so stellten die Autoren oft genug fest, daß der Pilz sein physiologisches Verhalten gegenüber seiner letzten Verwendung geändert hatte (vgl. Wehmer, 1919)[1]).

Es soll hier nicht eingehend erörtert sein, welcher Art diese Abänderungen sind, denen der *Aspergillus* unterworfen ist; es mögen mutative sein, die auch in lang andauernden Kulturen unter den variabelsten Bedingungen nicht wieder rückgängig gemacht werden können (vgl. E. Schiemann, 1912), doch ist zu vermuten, daß auch Dauermodifikationen im Sinne von Jollos (Archiv f. Protistenkunde, Bd. 43) dabei im Spiele sind. So viel hat sich jedenfalls ergeben, daß man bei mehrjähriger Kulturdauer niemals vor solchen Abänderungen sicher ist. Dieses Verhalten des Untersuchungsmaterials bringt eine Unsicherheit in die Beurteilung der physiologischen Resultate, die sich in der Literatur

1) Vgl. auch Bernhauer (Biochem. Zeitschr., Bd. 197, 1928, S. 306).

in einer ständigen Berufung auf allenfalls vorliegende Veränderungen der Reaktionsweise des betreffenden Pilzes ausdrückt, ohne daß solche nun auch in Wirklichkeit in allen Fällen festgestellt worden wären. Diese Unsicherheit ist nur dadurch zu beheben, daß man lediglich mit solchen Pilzstämmen physiologische Untersuchungen anstellt, deren Reaktionen in einer bestimmten Normalkultur bekannt sind. Nur so ist eine Rasse physiologisch zu identifizieren, und ihre Vergleichbarkeit mit anderen Rassen möglich bezw. der Grad ihrer Abweichung feststellbar. Es war nun zu überlegen, welcher Art diese Bedingungen sein müssen, die in diesem Sinne als „Normalkulturen" anzusehen sind. Jedenfalls müssen es solche sein, die die physiologischen Rassendifferenzen möglichst scharf hervortreten lassen. Eine Reihe von Erfahrungen hat nun übereinstimmend gelehrt, daß dies jedenfalls keine extremen Bedingungen sein dürfen, sondern solche, die in jeder Beziehung in der Mitte liegen: Wird z. B. der Stoffwechsel ganz einseitig, wie bei den stickstoffreien Kulturen, von den dann ganz enorm gesteigerten Energiebedürfnissen geleitet, so hatte sich gezeigt, daß die einzelnen Rassen in der Säureproduktion verhältnismäßig geringe Differenzen aufweisen. So energisch Rassendifferenzen sich unter mittleren Bedingungen bemerkbar machen mögen, wird es sich dabei trotzdem um relativ nebensächliche handeln. Bei einseitiger Inanspruchnahme jedoch, wie bei den stickstofffreien Bedingungen, kommen vermutlich die allen *Aspergillus*-Rassen gemeinsamen Grundeigenschaften zutage. Dies trifft aber auch bei der Ernährung mit großen Stickstoffmengen zu. Will man also die Rassendifferenzen anschaulich machen, so muß man solche Bedingungen umgehen; denn welche Fehler sich in der Beurteilung von Resultaten ergeben können, wenn man sie nach ihrem Verhalten bei extremen Bedingungen als physiologisch gleichartig ansieht, liegt auf der Hand.

Die von mir angewandten leicht reproduzierbaren Versuchsbedingungen mit 10 % Glukosenährlösungen, einem Zusatz von 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ und 30 mg Stickstoff in Form von Ammoniumtartrat scheinen dafür sehr geeignet, da sie das deutlichste Bild vom Verhalten der verschiedenen Rassen, wenigstens hinsichtlich des Säurebildungsvermögens, gaben. Es sind hier also für die „Normalkulturen" zur Identifikation der verschiedenen physiologischen Rassen solche Bedingungen gewählt worden, die aber auch die optimalen Ausbeuten an Zitronensäure

ergaben. Das ist durchaus nicht zufällig; denn tatsächlich treten unter den Bedingungen der Zitronensäurebildung auch hinsichtlich der anderen Säuren die stärksten Unterschiede hervor. Ähnliche Bestrebungen, wie die hier geschilderten, hat auch Bernhauer (1928) verfolgt. Er hat in seinen vergleichenden Untersuchungen über die Säurebildung verschiedener Rassen mit der „Methode der fertigen Pilzdecken" gearbeitet, hat aber in der Anwendung dieser Methode jeweils einen neuen Faktor in die Untersuchung gebracht, insofern er bei verschiedenen Rassen mit den Myzeldecken verschiedene Stickstoffmengen in die Versuchsanordnung einführt. Da er aber keine Stickstoffbestimmungen ausgeführt hat, geben seine Untersuchungen keine Anhaltspunkte über die Stickstoffkonzentration der Myzelien, von denen, wie wir sehen werden, die ganze Säurebildung maßgebend beeinflußt wird, und darum ist eine Beurteilung des Säurebildungsvermögens ohne Kenntnis der assimilierten Stickstoffmengen nicht eindeutig.

Die nächste Tabelle bringt nun eine Zusammenstellung der Analysenresultate der sämtlichen bearbeiteten Rassen unter den oben angegebenen Grundbedingungen. Summarisch geht aus der Tabelle 22 hervor, daß sämtliche Rassen starke Säurebildner sind, obwohl sie unter sich sehr große Differenzen aufweisen.

Der *Aspergillus niger* Tübingen ist ein starker Zitronensäurebildner, da die Glukonsäurebildung im Verhältnis zur Zitronensäureproduktion sehr gering ist. Er zeigt ein kräftiges Myzelwachstum bei beträchtlichem Glukoseverbrauch. Größere Mengen Oxalsäure treten erst nach 16tägiger Kulturdauer auf.

Der *Aspergillus niger cinnamomeus mont.* gleicht dem Tübinger Pilz in diesem physiologischen Verhalten sehr. Er produziert die Höchstmengen an Zitronensäure, während Glukonsäure nicht nachgewiesen werden konnte. Oxalsäure tritt ebenfalls erst gegen Ende der Versuchsdauer auf. Von den untersuchten Stämmen hat er den stärksten Glukoseverbrauch.

Der *Aspergillus niger fuscus mont.* steht unter diesen Rassen ziemlich in der Mitte. Die nach 8 Tagen vorhandene Glukonsäure ist offenbar nach 16 Tagen wieder verbraucht. Inzwischen ist eine ansehnliche Menge an Zitronen- und Oxalsäure aufgetreten. Auffallend ist noch der große Myzelzuwachs in der zweiten Hälfte der Kulturdauer.

Die beiden nächstfolgenden Pilze, der *Aspergillus niger ficuus* und der *Aspergillus niger* var. *altipes*, stimmen in ihrem Verhalten

weitgehend überein. Sie sind beide als Glukonsäurebildner anzusprechen, da ihre Zitronensäureproduktion erheblich geringer ist. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Stämmen ist die in den Kulturen vorhandene Oxalsäure sehr gering. Der *Aspergillus niger altipes* zeichnet sich außerdem durch das stärkste Myzelwachstum aus.

Der in der Tabelle zuletzt folgende *Citromyces* P_{23} zeigt hingegen von allen Rassen das schlechteste Myzelwachstum. Im übrigen ist auch er als Zitronensäurebildner zu charakterisieren. Auffallend ist der geringe Stickstoffgehalt des Myzels.

Überhaupt treten in dem Stickstoffgehalt der Myzelien bei sämtlichen Rassen auffallende Unterschiede hervor. Während der *Aspergillus niger ficuus* und *Aspergillus niger* var. *altipes* nahezu die ganze Menge des ihnen zur Verfügung gestellten Stickstoffs nach 8- und 16tägiger Kulturdauer in ihrem Myzel enthalten, ist bei den anderen Stämmen nur ein Teil, ja bei dem *Citromyces* beinahe nur noch die Hälfte desselben nach dieser Zeit in der Pilzdecke vorhanden. Weiter ist bemerkenswert, daß bei allen Rassen trotz Myzelzuwachs die absolute Stickstoffmenge in den Myzelien nach 8- und 16tägiger Versuchsdauer annähernd die gleiche ist. Die Kulturen von *Aspergillus niger* Tübingen zeigen aber, daß in den ersten 4 Tagen aller vorhandene Stickstoff assimiliert worden war, und daß erst nach der Sistierung der Stickstoffaufnahme wieder ein Teil davon in die Nährlösung zurückgegeben worden ist. Dabei stellt sich offenbar für die verschiedenen Rassen ein verschiedenes Gleichgewicht zwischen Myzelstickstoff und Stickstoffgehalt der Nährlösung ein. Aus der Tabelle geht hervor, daß bei den Glukonsäurebildnern dieses Verhältnis ein anderes ist als bei den Zitronensäurebildnern.

In den Untersuchungen über die Luftstickstoffassimilation hat sich bereits ergeben, daß sich der größte Teil des Stickstoffes in der Nährlösung befindet, ein Resultat, daß qualitativ mit diesen Ergebnissen übereinstimmt.

Ohne Zweifel findet also bei diesem Stickstoff-Hungerzustand eine Proteolyse statt, möglicherweise um eine Translokation des Stickstoffes von älteren abgestorbenen Hyphen in jüngere zu bewerkstelligen. Es sei aber darauf aufmerksam gemacht, daß Iwanof (1919; 1921) festgestellt hat, daß in lebenden Hefezellen bei normaler Lebenstätigkeit ebenfalls eine Proteolyse stattfindet.

Tabelle 22. Versuchsnummer 22.

Versuchs-Nr.	195	196	197	198	199	200	201
Zusammensetzung der Nährlösung	10,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$,						
Pilzstamm	*Aspergillus niger* Tübingen			*Aspergillus niger cinnamomeus*		*Aspergillus niger fuscus*	
Kulturdauer . Tage	4	8	16	8	16	8	16
Azidität . . . ccm	42,04	335,5	421,7	369,3	466,7	66,05	145,8
p_H	3,44	1,90	1,47	2,06	1,61	3,47	2,03
Kalzium-glukonat best. g	0,768	—	0,112	—	—	0,866	Spuren
Kalzium-glukonat ber.[1]) g	0,775	—	0,212	—	—	0,961	„
Glukonsäure, ber.[1]) g	0,678	—	0,186	—	—	0,841	„
Kalziumzitrat . g	—	2,690	2,743	2,924	3,188	Spuren	0,950
Zitronensäure . g	—	2,073	2,114	2,254	2,457	„	0,732
Kalziumoxalat . g	Spuren	0,061	0,541	Spuren	0,456	„	0,185
Oxalsäure . . g	„	0,037	0,336	„	0,281	„	0,114
Glukose . . . g	7,18	5,56	4,41	4,88	2,85	6,18	5,68
Glukoseverbrauch g	2,82	4,54	5,59	5,12	7,15	3,84	5,32
Ausbeute an Glukonsäure in % bez. a. d. Glukoseverbrauch	24,0	—	3,3	—	—	21,89	—
Ausbeute an Zitronensäure in % bez. a. d. Glukoseverbrauch	—	45,7	37,8	40,25	34,36	—	13,76
Ausbeute an Oxalsäure in % bez. auf den Glukoseverbrauch	—	0,80	6,00	—	3,94	—	2,14
Myzeltrockengewicht g	0,795	1,103	1,329	0,699	0,991	0,426	1,028
Stickstoffgehalt d. Myzels . . . mg	29,14	24,35	23,88	22,80	21,28	24,22	25,04
Stickstoffgehalt d. Myzels in % bez. auf das Trockengewicht	3,66	2,20	1,80	3,27	2,14	5,68	2,44

Wie bekannt ist, führt in allen pflanzlichen Organismen — sei es bei der Mobilisierung der Reserveeiweiße im Samen oder bei der Autolyse der Hefe — diese Eiweißspaltung unter dem Einfluß von proteo-

1) Aus der Azidität berechnet.

Temperatur: 30—32° C.

202	203	204	205	206	207	208	209

0,030 Stickstoff in Form von Ammoniumtartrat zu 100 ccm H_2O

Aspergillus niger ficuus		*Aspergillus niger altipes*		*Aspergillus niger* Göttingen		*Citromyces P23*	
8	16	8	16	8	16	8	16
74,1	111,9	59,81	63,27	204,8	291,3	128,5	229,1
2,43	1,96	2,24	2,18	2,11	1,75	2,24	1,69
1,051	0,90	0,630	0,327	—	—	—	—
1,232	1,167	0,762	0,352	—	—	—	—
1,087	1,021	0,666	0,307	—	—	—	—
Spuren	0,339	0,123	0,218	1,474	1,788	0,824	1,566
„	0,261	0,095	0,168	1,136	1,378	0,635	1,207
0,073	0,045	0,029	0,063	0,105	0,439	0,134	0,226
0,045	0,027	0,018	0,038	0,064	0,270	0,082	0,139
6,98	6,00	6,30	4,80	6,33	4,74	6,99	5,00
3,10	4,00	2,70	5,20	3,37	5,26	3,01	5,00
35,06	25,55	24,66	5,90	—	—	—	—
—	6,50	3,050	3,23	33,71	26,2	21,09	24,14
1,45	0,60	0,60	0,74	1,89	5,13	2,72	2,78
0,780	0,945	1,437	1,822	0,800	1,371	0,422	0,835
27,07	27,44	27,20	28,75	20,27	23,79	17,16	17,69
3,47	2,90	1,89	1,57	2,52	1,73	3,88	2,12

lytischen Fermenten zunächst zu Aminosäuren. Diese Aminosäuren werden dann „desaminiert", d. h. die Aminogruppe wird abgespalten. Der bei dieser Desaminierung in Form von Ammoniak wieder frei gewordene Stickstoff wird nun erneut zum Aufbau bei der Eiweißsynthese verwendet. „Der Kreislauf des Stickstoffes vollzieht sich

also zweimal über die Zwischenstufe der Ammoniakbildung" (Kostytschew, 1926).

Die Desaminierungsfähigkeit des *Aspergillus niger* hat schon Wehmer auf Peptonkulturen festgestellt; sie wurde später Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen[1]). Alle diese Arbeiten ergaben zunächst die kräftige Desaminierungsfähigkeit der Schimmelpilze, indem in den Kulturen stets Ammoniak auftrat. Neben dem Ammoniak bildete sich auf den dargebotenen verschiedenen Aminosäuren, synthetischen Polypeptiden und auf dem Pepton Oxalsäure in wechselnden Mengen, und es gelang Butkewitsch auf Peptonkulturen das Verhältnis der gebildeten Oxalsäure zu dem gebildeten Ammoniak etwa gleich dem des neutralen Ammoniumoxalates festzustellen. Weiter ergaben obige Untersuchungen zum Teil einen gewissen Einblick in den Verlauf der Desaminierung, der bei den Schimmelpilzen offenbar in der Hauptsache hydrolytisch unter Bildung der entsprechenden Oxysäuren vor sich geht, wobei es nicht ausgeschlossen scheint, daß auch ein oxydativer Verlauf der Desaminierung wie bei der Hefe unter CO_2-Abspaltung möglich ist.

Kostytschew hat nun die Möglichkeit erwähnt, daß die Bildung organischer Säuren — als nicht synthetische Vorgänge — event. in diesen Desaminierungsprozeß zu verlegen ist, in dem diese Säuren aus den stickstoffreien Spaltprodukten der Aminosäuren hervorgehen. Wetzel (1927) greift diesen Gedanken auf und „nimmt ebenfalls den stofflichen Zusammenhang zwischen Desaminierung und Säurebildung als wahrscheinlich gegeben an".

In den vorliegenden Versuchen mit sämtlichen *Aspergillus*-Rassen liegt also offenbar sowohl unter solchen Bedingungen, wo gebundener Stickstoff fehlt, als auch unter denen der Standardkulturen Eiweißspaltung und vermutlich Desaminierung vor. Ein eindeutiger Ammoniaknachweis ist mir allerdings nie gelungen, was nicht weiter verwunderlich ist, da ja bei dem großen Stickstoffbedarf des Pilzes die Eiweißsynthese vermutlich gleichzeitig

1) Butkewitsch (Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 38, 1903), Emmerling (Zentralbl. f. Bakt., II, 10, 1903, S. 273), Raciborski (Bull. de l'acad. des sciences de Cracovie, Cl. des sciences math. et nat., 1906, p. 733), Pringsheim, H. (Biochem. Zeitschr., Bd. 3, 1907, S. 121; Bd. 8, 1908, S. 128), Abderhalden u. Teruucki (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 47, 1906, S. 394), Ehrlich u. Jacobson (Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 44, 1911, S. 888), Ehrlich (Biochem. Zeitschr., Bd. 36, 1911, S. 447), Butkewitsch (Biochem. Zeitschr., Bd. 129, 1922, S. 445).

so intensiv stattfindet, daß der bei der Desaminierung abgespaltene Ammoniakstickstoff sofort wieder zum Aufbau verwendet wird. Fraglos handelt es sich hier um Plasmaeiweißstoffe; denn Reserveeiweiße werden in so stickstoffarmen Kulturen wohl kaum gebildet werden. In welcher Form nun der Stickstoff in den Nährlösungen vorliegt, ließ sich vorerst nicht sicher entscheiden. Vermutlich sind es α-Aminosäuren; denn man erhält mit Ninhydrin stets eine Reaktion auf solche.

Bezieht man nun noch in dem bereits oben erfolgten Vergleich des Verhältnisses von Myzelstickstoff zum Stickstoff der Nährlösung bei den Zitronen- und Glukonsäurebildnern den in seiner Säureproduktion unter diesen Standardbedingungen etwas intermediär stehenden *Aspergillus niger fuscus* ein, so zeigt sich auch hier eine Mittelstellung. Dies deutet ohne Zweifel auf einen quantitativen Zusammenhang zwischen Säurebildung und Stickstoffkonzentration der Myzelien hin.

Weiterhin wird ein auffallendes Resultat aus dem Vergleich der angehäuften Oxalsäuremengen bei den einzelnen Stämmen der Versuchsreihe 22 gewonnen: Es zeigt sich, daß bei den Zitronensäurebildnern weitaus mehr Oxalsäure vorhanden ist als bei den Glukonsäurebildnern. Auch hier ergibt sich bei *Aspergillus niger fuscus* ein in der Mitte stehender Wert.

Bei den Kulturen mit *Aspergillus niger* Tübingen in derselben Versuchsreihe wird auch der Befund von Kostytschew u. Tschechnokov (1927) bestätigt, daß keine bedeutenderen Mengen von Zitronensäure gebildet werden, solange der Pilz Stickstoff assimiliert, sondern daß erst mit fallender Stickstoffkonzentration des Myzels die Bildung dieser Säure einsetzt.

e) Säurebildung bei Vorhandensein von gebundenem Stickstoff.

1) Kultur auf ursprünglich stickstoffhaltiger Nährlösung.

Die Fragestellung für die nun folgenden Versuchsreihen 23—28 war zweierlei Art: Einmal, wie verhält sich die Assimilation atmosphärischen Stickstoffs bei Zugabe geringer Mengen gebundenen Stickstoffs, und zum anderen, wie verläuft unter diesen Umständen der Säurestoffwechsel? Die Resultate des ersten Problems wurden bereits im ersten Teil dieser Arbeit dargestellt; doch ist es unerläßlich, auf einige Einzelheiten hier noch einmal zurückzukommen,

da die energetischen Verhältnisse bei der Assimilation des Luftstickstoffs und die Glukonsäureproduktion bezw. der Glukoseverbrauch eng miteinander verknüpft sind. Bei der zweiten Fragestellung über den Ablauf des Säurestoffwechsels bei steigenden, aber geringen Zugaben von gebundenem Stickstoff rückte nun vor allem das Problem der Zitronensäurebildung in den Vordergrund. Wie aus dem Versuch 191 (Tab. 20) zu ersehen ist, bildet der *Aspergillus niger* Tübingen mit 10 mg Stickstoff als Ammoniumtartrat in der Nährlösung bereits eine bedeutende Menge dieser Säure, während dagegen in stickstoffreien Kulturen keine nachgewiesen werden konnte. So lag es auf der Hand, zunächst die Menge gebundenen Stickstoffs zu bestimmen, bei der die Zitronensäureproduktion überhaupt einsetzt.

Die Versuche wurden wieder in der gleichen seither angewandten Anordnung mit der üblichen Durchlüftungsweise angestellt,

Tabelle 23. Versuchsreihe 23.

Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	210	211	212	213	214	215
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 0,5 mg N, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O.					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	26,11	247,6
p_H	7,62	7,52	7,54	7,35	3,81	2,10
Kalziumglukonat . . g	0,405	1,099	1,981	2,758	3,436	4,491
Glukonsäure . . . . g	0,354	0,961	1,733	2,413	3,006	3,929
Kalziumoxalat . . . g	0,099	0,142	0,204	0,276	0,441	1,716
Oxalsäure . . . . g	0,061	0,087	0,126	0,170	0,271	1,057
Glukose . . . . . g	4,25	3,61	2,71	2,04	1,36	—
Glukoseverbrauch . . g	0,75	1,39	2,49	2,96	3,64	5,00
Glukonsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	47,2	69,2	69,6	81,5	82,6	78,6
Oxalsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	8,1	6,3	5,0	5,7	7,5	21,1
Myzelgewicht . . mg	25,34	34,97	49,00	62,37	82,91	161,92
Stickstoffgehalt des Myzels . . . . mg	0,41	0,37	0,57	0,74	0,80	1,60
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Myzeltrockengewicht .	1,61	1,06	1,17	1,31	0,97	0,99
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	0,09	0,35	1,02	1,60	2,09	2,71
Gesamtstickstoff . . mg	0,5	0,72	1,59	2,34	2,89	4,31

wobei den Kulturen 1,0 g Kalziumkarbonat sowie wechselnde Mengen von Ammoniumtartrat zugefügt wurden. So wurden in der Versuchsreihe 23 den Kulturlösungen zunächst 0,5 mg Stickstoff in Form dieser Verbindung zugegeben. Der Vergleich der Tabelle 23 mit den Resultaten der analogen Versuchsreihe 15, aber ohne gebundenen Stickstoff, zeigt, daß sowohl die Säureproduktion wie der Glukoseverbrauch in ihren Endresultaten noch kaum voneinander abweichen. Wohl aber ist der Verlauf des Myzelwachstums von Anfang an ein anderer, indem nach 8 Tagen bereits ein Myzel von 25 mg erhalten wurde, das bei den von gebundenem Stickstoff freien Kulturen selbst nach 16tägiger Versuchsdauer noch etwa 10 mg weniger beträgt. Die dadurch bedingten Abänderungen im Säurestoffwechsel gleichen sich aber nach kurzer Zeit aus, wodurch, wie oben schon erörtert, zwischen den beiden Kulturreihen in ihren Endresultaten noch kein auffallender Unterschied fest-

Tabelle 24. Versuchsreihe 24.

Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	216	217	218	219	220	221
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1 mg N, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O.					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	140,5	226,6
p_H	7,59	7,62	7,49	7,21	2,49	2,03
Kalziumglukonat . . g	0,364	1,129	2,471	3,500	4,371	4,411
Glukonsäure . . . . g	0,319	0,986	2,162	3,061	3,819	3,859
Kalziumoxalat . . . g	0,132	0,217	0,260	0,318	0,952	1,641
Oxalsäure . . . . g	0,087	0,134	0,161	0,196	0,587	1,011
Glukose . . . . . g	4,06	3,36	2,32	1,48	0,37	0,28
Glukoseverbrauch . . g	0,94	1,64	2,68	3,52	4,63	4,72
Glukonsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	33,9	60,1	80,7	86,9	82,5	81,8
Oxalsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	8,6	8,2	6,0	5,6	12,7	21,6
Myzelgewicht . . mg	37,94	61,72	82,79	93,05	168,28	182,53
Stickstoffgehalt des Myzels . . . . mg	0,75	0,67	0,86	0,94	1,60	1,90
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . mg	1,97	1,09	1,02	1,00	0,95	1,04
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	0,25	0,34	0,83	1,05	2,09	2,16
Gesamtstickstoff . . mg	1,00	1,01	1,69	1,99	3,69	4,06

zustellen ist. Dagegen treten in der nächsten Versuchsreihe 24 mit 1,0 mg Stickstoffzugabe schon recht deutliche Unterschiede gegenüber der Kulturreihe 15 auf. Diese geringe Stickstoffmenge bedingt nach 8 Tagen schon eine Myzelernte von 38,0 mg, die dann nach 16 Tagen 62,0 mg beträgt. Weiterhin erfolgen aber mit beginnender Luftstickstoffassimilation die Myzelzunahmen zunächst wie in stickstoffreien Kulturen. Die 62 mg Myzel sind fast nur auf Kosten des zugegebenen Stickstoffs herangewachsen und hatten einen Glukoseverbrauch von 1,64 g, der dann bei beginnender Luftstickstoffassimilation für 20 mg Myzelgewicht um rund 1,0 g Glukose steigt. Vergleicht man weiter auch diesen Glukoseverbrauch der 62 mg schweren Pilzdecke mit dem ungefähr gleich großen Myzel in von vornherein stickstoffreier Kultur von 64 mg (Tab. 15, Versuch 163), so ergibt sich, daß dieses einen doppelt so großen Glukoseverbrauch hatte, eine Differenz, die, wie früher schon betont, auf den erhöhten Energiebedarf bei erschwerter Stickstoffaufnahme zurückzuführen ist. Diese energetischen Verhältnisse treten außerdem auch deutlich in der Glukonsäureproduktion bei den beiden zu vergleichenden Versuchsreihen hervor, indem diese auf die Myzelgewichte bezogen bei der Versuchsreihe 15 nicht nur absolut, sondern auch in der prozentualen Ausbeute der Säure auf den Glukoseverbrauch bezogen, höher sind. So zeigt der Versuch 163 Tabelle 15 einen Glukoseverbrauch von 3,28 g mit 80 % Glukonsäureausbeute (2,62 g), während das gleich große Myzel des Versuches 217 Tabelle 24 einen solchen von nur 1,64 g mit 60 % Ausbeute (0,98 g) Glukonsäure hat.

Würde der Pilz weniger Glukose verbrauchen, diese dafür aber weiter als nur bis zur Glukonsäure veratmen, so wäre die Energieausbeute ohne Zweifel größer; da er aber bei größerem Energiebedarf unter diesen Bedingungen lediglich mehr Glukose bis zur Glukonsäure oxydiert, muß daraus geschlossen werden, daß dieser Weg der Energiebeschaffung für den Pilz der einfachere ist. Rein theoretisch könnte durch Weiteroxydation der Glukonsäure zur Zuckersäure wohl zum mindesten ebensoviel Energie gewonnen werden wie durch die Oxydation der Glukose zu Glukonsäure. Es ist seltsam, daß dieser Weg einer weiteren Oxydation der Glukonsäure zur Zuckersäure offenbar nicht eingeschlagen werden kann; sonst wäre nicht einzusehen, warum letztere Säure in den sämtlichen Versuchen nicht nachzuweisen war.

Die Oxalsäurewerte sind auf die Myzelgewichte bezogen in den mit 1,0 mg Stickstoff versetzten Kulturen etwas geringer als in der Versuchsreihe 15 ohne Ammoniumtartrat. So produzierte z. B. ein Myzel von 93 mg in 32 Tagen Kulturdauer 0,196 g Oxalsäure, während ein Myzel von 64 mg in einer von gebundenem Stickstoff freier Nährlösung nach 40 Versuchstagen 0,244 g dieser Säure bildete (vgl. Tab. 24, Versuch 219 und Tab. 15, Versuch 163). Nach der Reaktionsänderung der Nährlösung tritt wie in den vorhergehenden Versuchen die plötzlich vermehrte Oxalsäurebildung ein, deren Menge das seitherige Verhältnis von Myzelzuwachs zu Oxalsäureproduktion nunmehr weit überschreitet.

In der Versuchsreihe 25 wurden 2,0 mg Stickstoff den Nährlösungen von vornherein zugegeben. Es ist erstaunlich, was für

Tabelle 25. Versuchsreihe 25.

Temperatur: 20—22 ° C.

Versuch Nr.	222	223	224	225	226	227
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 2 mg N, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität ccm	—	—	—	—	143,2	166,8
p_H	7,61	7,59	7,38	7,34	2,27	1,96
Kalziumglukonat g	0,501	1,020	1,904	2,791	3,489	3,695
Glukonsäure g	0,438	0,892	1,666	2,442	3,052	3,233
Kalziumzitrat g	Spuren	Spuren	—	Spuren	Spuren	—
Zitronensäure g	„	„	—	„	„	—
Kalziumoxalat g	0,201	0,330	0,382	0,443	1,227	1,393
Oxalsäure g	0,124	0,204	0,235	0,273	0,758	0,858
Glukose g	4,12	3,43	2,65	1,77	1,15	0,92
Glukoseverbrauch g	0,88	1,57	2,35	2,88	3,85	4,08
Glukonsäure in % bezogen auf d. Glukoseverbrauch	49,35	56,83	70,9	84,0	79,3	79,2
Oxalsäure in % bezogen auf d. Glukoseverbrauch	14,0	13,0	10,0	9,5	19,7	21,0
Myzelgewicht mg	60,78	105,42	122,81	141,06	217,37	227,30
Stickstoffgehalt des Myzels mg	1,29	1,37	1,23	1,49	2,35	2,30
Stickstoffgehalt in % bezogen auf das Trockengewicht	2,12	1,30	1,00	1,06	1,08	1,11
Stickstoffgehalt der Nährlösung mg	0,74	0,73	1,13	1,09	0,89	1,26
Gesamtstickstoff mg	2,03	2,10	2,36	2,58	3,24	3,56

ein umfangreiches Myzel auf Kosten einer so geringen Menge Stickstoff heranzuwachsen vermag: Es sind hier über 100 mg, die nach 16tägiger Kulturdauer gebildet wurden. Der Gesamtglukoseverbrauch ist dabei noch viel geringer geworden; denn für eine Myzelernte von 60 mg nach 8 Kulturtagen (Versuch 222) beträgt dieser 0,98 g, während er, wie vorher schon behandelt, bei einer Myzelernte von 64 mg nach allerdings 40tägiger Kulturdauer 3,28 g war. Der Höchstverbrauch an Zucker und die stärkste Glukonsäureproduktion setzt mit beginnender Luftstickstoffassimilation nach ungefähr 16 Versuchstagen ein. Der Verlauf der Oxalsäurebildung ist analog der vorhergehenden Versuchsreihe. Als neu treten hier zum ersten Male Spuren von Zitronensäure auf.

Tabelle 26. Versuchsreihe 26.

Temperatur: 20—22 ° C.

Versuch Nr.	228	229	230	231	232	233
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 4 mg N, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	127,4	167,6	211,0
p_H	7,59	7,62	7,33	2,21	1,98	1,81
Kalziumglukonat . . g	0,714	1,462	1,935	2,600	2,720	2,918
Glukonsäure . . . . g	0,624	1,279	1,693	2,274	2,379	2,554
Kalziumzitrat . . . g	0,094	0,131	0,088	0,090	0,104	0,128
Zitronensäure . . . g	0,072	0,101	0,067	0,069	0,080	0,098
Kalziumoxalat . . . g	0,264	0,610	0,692	1,256	1,504	1,700
Oxalsäure . . . . g	0,163	0,376	0,426	0,774	0,926	1,047
Glukose . . . . . g	3,71	2,97	2,43	1,78	1,55	1,50
Glukoseverbrauch . . g	1,29	2,03	2,57	3,22	3,45	3,50
Glukonsäure in % bezogen auf d. Glukoseverbrauch	48,4	63,0	65,8	70,6	69,0	72,9
Zitronensäure in % bez. auf d. Glukoseverbrauch	5,6	5,0	2,6	2,2	2,33	2,8
Oxalsäure in % bezogen auf d. Glukoseverbrauch	12,6	18,5	16,6	24,0	26,8	29,9
Myzelgewicht . . mg	93,72	167,94	198,45	245,10	261,79	254,44
Stickstoffgehalt des Myzels . . mg	3,00	2,82	2,71	3,22	3,01	2,80
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	3,20	1,68	1,36	1,31	1,15	1,10
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	1,02	1,19	1,30	1,22	1,51	1,67
Gesamtstickstoff . . mg	4,02	4,01	4,01	4,45	4,25	4,48

Die Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der mit 4 mg gebundenem Stickstoff versetzten Kulturen. Da unter diesen Bedingungen von dem Pilz kaum mehr Luftstickstoff assimiliert wird, ist selbst bei noch höheren Myzelwerten als in den seitherigen Versuchsreihen der Glukoseverbrauch und die Glukonsäurebildung weiter gesunken. Die Oxalsäureproduktion ist dem stärkeren Myzelwachstum entsprechend größer geworden; die in den seitherigen Versuchen bei der Reaktionsänderung der Nährlösung so auffallend erfolgte Mehrproduktion ist dagegen erheblich geringer geworden. Die Zitronensäure wurde in bereits bestimmbaren Mengen gebildet, und es ließ sich nachweisen, daß die Produktion der Säure in den ersten 16 Kulturtagen erfolgt sein muß, da diese Analysenwerte

Tabelle 27. Versuchsreihe 27.

Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	234	235	236	237	238	239
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 8 mg N, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Kulturdauer . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	76,71	157,1	165,7	214,6
p_H	7,56	7,59	3,01	1,91	1,87	1,72
Kalziumglukonat . g	0,986	1,902	1,797	2,245	2,114	2,311
Glukonsäure . . g	0,862	1,664	1,572	1,963	1,850	2,021
Kalziumzitrat . . g	0,092	0,276	0,373	0,351	0,346	0,382
Zitronensäure . . g	0,071	0,212	0,288	0,270	0,367	0,294
Kalziumoxalat . . g	0,077	0,399	1,016	1,499	1,591	1,781
Oxalsäure . . . g	0,047	0,246	0,626	0,924	0,980	1,097
Glukose . . . . g	3,60	2,67	2,30	1,92	1,89	1,80
Glukoseverbrauch . g	1,40	2,33	2,70	3,08	3,11	3,20
Glukonsäure in % des Glukoseverbrauches . . .	61,6	71,4	58,2	63,7	59,5	57,8
Zitronensäure in % des Glukoseverbrauches .	5,1	9,1	10,6	8,8	8,6	9,2
Oxalsäure in % des Glukoseverbrauches . . .	3,4	10,6	23,2	30,0	31,5	34,3
Myzelgewicht . . mg	142,40	240,97	281,98	312,46	317,42	313,46
Stickstoffgehalt des Myzels . . mg	6,18	5,05	5,82	4,75	5,43	4,21
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	4,34	2,09	2,06	1,52	1,71	1,34
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	—	—	—	—	—
Gesamtstickstoff . mg	—	—	—	—	—	—

sich während der folgenden weiteren vier Wochen Versuchsdauer nicht mehr veränderten.

Verdoppelt man die Ammontartratzugaben für die Nährlösung noch weiter, so daß in jeder Kulturlösung von vornherein 8 mg Stickstoff sich befinden, so erhöhen sich die Zitronensäureausbeuten um beinahe das Dreifache, wie aus der Tabelle 27 hervorgeht. Ihre Bildung fällt in der Hauptsache ebenfalls in die ersten 16 Kulturtage. Interessant ist nun, daß die Oxalsäureproduktion auf das Myzelgewicht bezogen während dieser Versuchsdauer geringer geworden ist, um dann nach dem Aufhören der Zitronensäurebildung wie in den bisherigen Versuchen anzusteigen. Daraus ist zu schließen, daß zuerst die Zitronensäure und dann erst die Oxalsäure entsteht; dies spricht aber auch weiter dafür, daß ein unmittelbarer Zusammenhang in der Bildungsweise beider Säuren besteht.

Die Bildung der Zitronensäure erfolgt hier zum Teil in einer Kulturlösung, die noch Kalziumkarbonat enthält, also scheinbar bei alkalischer Reaktion der Nährlösung. Faktisch war das aber nicht der Fall. Obwohl auf dem Boden des Kulturgefäßes noch Karbonat lag, war die Reaktion der Flüssigkeit in der unmittelbaren Umgebung der Hyphen doch sauer; ja es zeigte sich sogar, daß trotz der alltäglichen Durchlüftung und der dabei stattfindenden Durchmischung der Nährlösungen schon am anderen Morgen die Flüssigkeiten in der Umgebung der Myzelien wieder sauer reagierten, was sich deutlich dann nachweisen ließ, wenn man an der Wand des Kulturgefäßes einen Tropfen einer Indikatorenlösung herunterlaufen ließ, dessen Verfärbung das Reaktionsgefälle von den Hyphen bis zum Bodensatz anzeigte. Diese rasche Säuerung in unmittelbarer Nähe der Hyphen kommt wohl vornehmlich dadurch zustande, daß die Atmungskohlensäure aus dem vorhandenen Kalziumglukonat etwas Glukonsäure frei macht.

Die letzte Versuchsreihe 28 endlich wurde noch mit 12 mg Stickstoff pro Kulturlösung versetzt. Die Analysen zeigen wiederum, daß die Zitronensäurebildung in die ersten Versuchswochen fällt, während die Oxalsäureproduktion deutlich erst nach dem Aufhören der ersteren einsetzt. Das Gewichtsverhältnis beider Säuren hat aber zugunsten der Zitronensäure zugenommen. Der Glukoseverbrauch und die Glukonsäureproduktion entsprechen den Ergebnissen der vorhergehenden Versuchsreihen.

Tabelle 28. Versuchsreihe 28.

Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	240	241	242	243	244	245
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 12,0 mg N, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 cm H_2O					
Kulturdauer . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	122,3	240,6	223,4	243,5
p_H	7,62	7,31	2,58	1,81	1,96	1,73
Kalziumglukonat . g	1,285	2,060	2,106	1,995	2,202	2,381
Glukonsäure . . . g	1,125	1,803	1,842	1,705	1,926	2,083
Kalziumzitrat . . g	Spuren	0,630	0,886	0,915	0,791	0,856
Zitronensäure . . g	"	0,485	0,683	0,705	0,609	0,660
Kalziumoxalat . . g	—	0,075	0,811	1,723	1,590	1,637
Oxalsäure . . . g	—	0,046	0,499	1,062	0,980	1,001
Glukose . . . . g	3,18	2,19	1,95	1,51	1,47	1,18
Glukoseverbrauch . g	1,82	2,81	3,05	3,49	3,53	3,86
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	61,8	64,2	60,4	48,9	53,3	56,8
Ausbeute an Zitronensäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	17,3	22,4	20,2	17,3	17,3
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	1,6	16,4	30,4	27,8	26,4
Myzeltrockengewicht mg	190,08	310,53	390,02	446,90	437,72	462,38
Stickstoffgehalt des Myzels . . mg	7,53	7,97	7,20	6,76	7,72	8,30
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	3,95	2,56	2,02	1,51	1,76	1,79

Wie in den vorhergehenden Abschnitten seien nun wieder die Resultate zusammengefaßt: Bei der Zugabe von Stickstoff steigend bis zu 4 mg in Form von Ammoniumtartrat wird die Luftstickstoffassimilation von Stufe zu Stufe geringer, um schließlich ganz aufzuhören. Durch den dabei verringerten Energiebedarf wird der Glukoseverbrauch und die Glukonsäurebildung entscheidend beeinflußt, indem beide mit abnehmender Luftstickstoffassimilation kleiner werden. So sind z. B. bei einer Zugabe von 0,5 mg Stickstoff der Glukoseverbrauch nach 48tägiger Kulturdauer 5,0 g, die Glukonsäureproduktion 3,92 g und die Myzelernte 161 mg, während bei einer Stickstoffzugabe von 4 mg der Glukoseverbrauch in derselben

Zeit 3,5 g ausmacht, und die Glukonsäure und Myzelernte 2,5 g bezw. 254,4 mg betragen. Mit höheren Stickstoffzugaben steigen diese Werte natürlich wieder an, da durch den vermehrten Stickstoff auch ein höheres Myzelwachstum ermöglicht wird.

Diese Versuchsreihen ergaben weiter, daß sich bei Zugabe von 2 mg gebundenem Stickstoff eine Zitronensäurebildung in den Kulturen feststellen läßt. Wird dieser Stickstoffzusatz auf 4 mg erhöht, so ist die gebildete Säure bereits quantitativ bestimmbar. Weitere Zusätze erhöhen die Zitronensäureproduktion zunächst, wobei jedoch keinerlei konstantes Zahlenverhältnis zwischen der gebildeten Säure und der zugesetzten Stickstoffmenge sich einstellt. Was den zeitlichen Ablauf der Zitronensäurebildung anlangt, so findet diese in den ersten 16 Tagen der Versuchsdauer statt. Endlich ließ sich noch feststellen, daß die Oxalsäurebildung erst nach Ablauf der Zitronensäurebildung in ansehnlicher Menge einsetzte, ohne daß dann die gebildete Zitronensäure etwa wieder verschwindet.

Wie sich in den Versuchen mit Kulturen ohne gebundenen Stickstoff schon ergeben hatte, liegt das Optimum der Oxalsäurebildung bei saurer Reaktion des Nährmediums. Es war dabei aber noch nicht entschieden worden, ob diese Reaktionsweise des Pilzes nur durch die extremen Verhältnisse bei der Luftstickstoffassimilation bedingt wurde, oder ob es sich dabei um ein allgemeines, auch bei mehr normalen Bedingungen gegebenes Verhalten handelt. Wird in einer mit 1,0 g Kalziumkarbonat versetzten Kultur bis zu 2 mg gebundener Stickstoff in Form von Ammoniumtartrat zugegeben, so zeigen die Resultate, daß der Unterschied gegenüber den Kulturen ohne gebundenen Stickstoff noch nicht besonders groß ist. Auch hier nimmt die Oxalsäurebildung sprunghaft zu, wenn durch die gebildete freie Glukonsäure das Nährmedium angesäuert wird. Die gebildete Oxalsäure wird dann zunächst durch das vorhandene Kalzium gebunden und neutralisiert, ein Vorgang, der natürlich seine Grenzen in der Menge des zugesetzten Kalziumkarbonats findet. Ist diese Grenze erreicht, so wird die weitere Oxalsäureproduktion eingestellt, da durch die nun freiwerdende Oxalsäure und die schon vorhandene Glukonsäure der p_H so weit erniedrigt wird, daß eben mehr oder weniger bald das Pilzwachstum aufhört. Erhöht man die Stickstoffmengen jedoch auf 4, 8 und 12 mg, so wird immer weniger Oxalsäure bei der

Reaktionsänderung gebildet, sogar so sehr, daß dieser „Oxalsäuresprung“ in der Versuchsreihe mit 12 mg gebundenem Stickstoff bereits gänzlich verschwunden ist. Bei der Zunahme der Myzelmenge, wie sie durch den erhöhten Stickstoffgehalt der Nährlösung nun gleichzeitig ermöglicht wird, ist von vornherein eine Erhöhung der Oxalsäurebildung zu erwarten. Da die Kalziumkarbonatmenge aber die gleiche geblieben ist, so wird durch die anfänglich gleich erhöhte Oxalsäureproduktion das vorhandene Kalziumkarbonat einmal rascher verbraucht, und der Sprung zeitlich nach vorn verlagert, andererseits wird im Verlaufe der Reaktionsänderung nach dem Verbrauch des Karbonats der Grenzwert der Wachstumshemmung durch die Azidität aber auch viel schneller erreicht. Dadurch wird der Unterschied zwischen der bei Beginn der Reaktionsänderung vorhandenen und dem überhaupt produzierten Endwert an Oxalsäure mit zunehmenden Stickstoffgaben immer geringer, bis er endlich ganz verschwindet. Somit bestehen also keine prinzipiellen Differenzen zwischen den Kulturen mit und ohne Stickstoff; denn auch in letzteren liegt das Optimum der Oxalsäurebildung bei saurer Reaktion des Nährmediums.

Diese Erkenntnis wird nun nicht etwa dadurch eingeschränkt, daß sich bei näherer Betrachtung einige Schwierigkeiten ergeben. Bei erhöhtem Stickstoffzusatz schon von 12 mg ab erfolgt nämlich ein Myzelzuwachs auch noch bei einer Azidität der Lösung, die bei geringeren Stickstoffgaben kein Myzelwachstum mehr gestattet und der eine Oxalsäureanhäufung nicht mehr parallel geht, was nur so zu erklären ist, daß die gebildete Oxalsäure sekundär oxydiert wird. Es muß also durch die höhere Stickstoffzugabe das Oxydationspotential des Pilzes erhöht worden sein. Um hier zu quantitativen Ergebnissen zu gelangen, müßte die Untersuchung des Gaswechsels durchgeführt werden.

Ferner findet man, daß bei einer Zugabe von 8 und 12 mg gebundenen Stickstoffes die Oxalsäureproduktion erst später einsetzt als in Kulturen mit geringeren Mengen. Beachtet man jedoch, daß bei diesen Stickstoffgaben Zitronensäure in erheblicher Menge auftritt, so wird auch diese Differenz verständlich. Im Säurebildungsprozeß wird also die Oxalsäure offenbar durch die Zitronensäure ersetzt, so lange die Bedingungen für ihre Bildung gegeben sind; danach setzt dann die reichliche Oxalsäurebildung wieder ein.

Diese beiden Schwierigkeiten lassen sich also auflösen und berühren die oben abgeleitete Erkenntnis, daß das Optimum der Oxalsäurebildung bei saurer Reaktion des Nährmediums liegt, in keiner Weise. Experimentell läßt sich diese Tatsache jedoch nur dann nachweisen, wenn die Kulturbedingungen die Oxalsäure in saurer Lösung abzufangen erlauben, wobei jedoch die Azidität dieser Lösung die Säureresistenz des Pilzes nicht überschreiten darf. Der glückliche Umstand, daß bei dem Stickstoffmangel meiner Kulturen die Glukonsäureproduktion eine so ausnehmende Steigerung erfährt, und daß diese Säure infolge ihrer geringen Dissoziation eine Azidität des Mediums bedingt, die das Myzelwachstum fördert, ließ die beobachteten Erscheinungen in aller Deutlichkeit hervortreten.

2) Reaktion von Hungermyzelien auf spätere Stickstoffzugaben.

In allen meinen bisherigen Untersuchungen war es auffallend, daß die Zitronensäure, wenn sie überhaupt gebildet wurde, stets in den ersten Tagen auftrat. Wie Butkewitsch festgestellt hat, liegt das Optimum der Zitronensäurebildung im allgemeinen in relativ stark saurer Reaktion. Wenn sich nun hat zeigen lassen, daß diese Säure auch bei noch alkalischer oder höchstens schwach saurer Reaktion der Lösung gebildet wird, wie dies ja in den ersten 16 Tagen der Kulturdauer der Fall ist, und daß sie ferner bei abnehmendem p_H keineswegs mehr zunimmt, so ist es ohne weiteres klar, daß für ihr Auftreten in den ersten Kulturtagen etwas anderes als die Wasserstoffionenkonzentration verantwortlich sein muß. In den folgenden Versuchen sollte nun ermittelt werden, wie weit das Auftreten der Zitronensäure mit den Differenzen des Stickstoffgehaltes im Myzel zusammenhängt. Wie die Versuche mit den von vornherein zugegebenen Stickstoffmengen zeigten, durchläuft das Myzel in seiner Entwicklung die verschiedensten Phasen prozentualer Stickstoffwerte, bis das Minimum von etwa 1,0% nicht mehr unterschritten werden kann. Nun hat sich aus Kostytschews und eigenen Ergebnissen gezeigt, daß die Zitronensäurebildung erst nach dem Aufhören der Stickstoffassimilation einsetzt. Es fragt sich daher weiter, ob die Zitronensäureproduktion bei jeder abnehmenden Stickstoffkonzentration einsetzt oder ob sie im Zusammenhang mit bestimmten Werten steht. Darüber läßt sich aber nur dann etwas aussagen, wenn verschiedene, aber be-

stimmte Anfangskonzentrationen von Stickstoff im Myzel beim Versuch auftreten. Diese Konzentrationen wurden dadurch erreicht, daß verschieden lange unter den Bedingungen der Luftstickstoffassimilation gezogenen Myzelien nachträglich 4, 6 und 8 mg gebundener Stickstoff in Form von Ammoniumtartrat zugesetzt wurde, Mengen, die nach 2 oder 3 Tagen bereits assimiliert waren. Selbstverständlich ist nicht anzunehmen, daß nun sämtliche Hyphen den gebotenen Stickstoff genau gleichmäßig aufnehmen; doch spricht der Umstand, daß die Stickstoffbestimmungen von verschiedenen Teilen des getrockneten Myzels gleichmäßige Werte ergaben, für keine großen Differenzen dieser Art innerhalb der Pilzdecke. Es ist schon daran zu denken, daß ein Vergleich der Resultate bezüglich des prozentualen Stickstoffgehaltes der Myzelien nur annähernd richtig sein kann, da schließlich mit verschiedenen Mengen toter Hyphen gerechnet werden muß.

Die schon in den vorhergehenden Versuchen angedeuteten Beziehungen zwischen der Stickstoffkonzentration des Myzels und der Zitronensäureproduktion ließen sich in der Tat in den folgenden Versuchen nun exakt nachweisen, wie die in den Tabellen 29, 30, 31 und 32 aufgeführten Versuchsreihen zeigen. In der Tabelle 31 sind in der vierten Kolumne die Mittelwerte aus drei Versuchen angeführt, die unter den Bedingungen der Luftstickstoffassimilation bei 40tägiger Kulturdauer erhalten wurden. In den Versuchen 267 bis 272 wurde sechs analogen Kulturen 4, 6 und 8 mg gebundener Stickstoff als Ammoniumtartrat zugesetzt, und dann je drei Kulturen nach 3 und 6 Tagen analysiert. Dabei zeigte sich, daß weder bei einem Zusatz von 4, noch von 6 mg gebundenem Stickstoff Zitronensäure gebildet wurde, indessen bei der Zugabe von 8 mg nach sechstägiger Kulturdauer eben Spuren mit dem Denigèsschen Reagens nachweisbar waren. Betrachtet man die Anfangsstickstoffkonzentrationen der Myzelien, so ergibt sich, daß bis zu 2,5 % Anfangsstickstoffkonzentration überhaupt keine Zitronensäure gebildet wurde, während bei einer Konzentration von 2,8 % eben Spuren davon auftraten.

In den Versuchsreihen 26 und 27 waren bei von vornherein zugesetzten Stickstoffmengen in der Höhe von 4 und 8 mg Durchschnittsausbeuten von 0,081 bezw. 0,233 g Zitronensäure erhalten worden, wobei allerdings die Bildung in eine Zeit fiel, in der die Myzelien mindestens über 2 % Stickstoff enthalten mußten. So ist also ein Zusammenhang zwischen den Resultaten dieser beiden Versuchsreihen ohne weiteres herstellbar.

Tabelle 29. Versuchsreihe 29.

Versuch Nr.	246	247	248	Mittel	249	250	251	252	253	254
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O. Temperatur 30—32° C				Zugegebene Stickstoffmenge = 4 mg. Temp.: 20—22° C		Zugegebene Stickstoffmenge = 6 mg. Temp.: 20—22° C		Zugegebene Stickstoffmenge = 8 mg. Temp.: 20—22° C	
Kulturdauer . . . . . Tage	16	16	16	16	3	6	3	6	3	6
Azidität . . . . . ccm	100,2	87,68	83,48	**90,45**	110,4	297,3	112,8	262,5	137,5	281,6
pH	2,93	2,88	2,71	**2,84**	2,43	1,45	2,38	1,61	2,16	1,64
Kalziumglukonat . . . . . g	1,702	1,563	1,480	**1,582**	1,800	2,730	1,700	2,597	1,905	3,283
Glukonsäure . . . . . g	1,490	1,368	1,295	**1,384**	1,575	2,388	1,484	2,272	1,667	2,872
Kalziumzitrat . . . . . g	—	—	—	—	—	Spuren	Spuren	0,060	Spuren	0,194
Zitronensäure . . . . . g	—	—	—	—	—	„	„	0,046	„	0,149
Kalziumoxalat . . . . . g	0,029	0,042	0,057	**0,046**	0,135	1,111	0,164	0,874	0,314	0,722
Oxalsäure . . . . . g	0,018	0.026	0,041	**0,028**	0,083	0,685	0,101	0,539	0,194	0,445
Glukose . . . . . g	3,22	3,39	3,37	**3,33**	2,26	1,71	2,19	1,75	1,51	0,98
Glukoseverbrauch . . . . g	1,78	1,61	1,63	**1,67**	2,74	3,29	2,81	3,25	3,49	4,02
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	83,7	85,0	79,4	**82,7**	57,5	72,7	52,8	69,9	47,8	71,4
Ausbeute an Zitronensäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	—	—	—	—	—	—	—	1,43	—	3,7
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	1,0	1,6	2,5	**1,7**	3,0	20,8	3,6	16,6	5,5	11,1
Myzeltrockengewicht . . mg	37,31	31,72	36,00	**35,01**	162,92	285,25	181,76	300,55	242,18	360,77
Stickstoffgehalt des Myzels mg	0,58	0,41	0,36	**0,45**	4,37	3,72	5,86	4,90	4,82	6,07
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen a. d. Trockengewicht	1,55	1,22	0,99	**1,27**	2,68	1,30	3,23	1,63	3,47	1,68

Tabelle 30. Versuchsreihe 30.

Versuch Nr.	255	256	257	Mittel	258	259	260	261	262	263
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O. Temperatur 30—32° C				Zugegebene Stickstoffmenge = 4 mg. Temp.: 20—22° C		Zugegebene Stickstoffmenge = 6 mg. Temp.: 20—22° C.		Zugegebene Stickstoffmenge = 8 mg. Temp.: 20—22° C	
Kulturdauer . . . . . Tage	32	32	32	32	3	6	3	6	3	6
Azidität . . . . . ccm	161,4	170,9	178,3	**170,2**	219,7	341,9	205,1	268,3	173,5	241,1
pH	2,09	2,14	2,24	**2,15**	1,79	1,47	1,97	1,69	2,21	1,58
Kalziumglukonat . . . . . g	2,901	3,193	3,560	**3,218**	3,200	4,076	3,519	3,673	3,071	2,607
Glukonsäure . . . . . g	2,537	2,794	3,110	**2,814**	2,799	3,566	3,079	3,213	2,686	2,281
Kalziumzitrat . . . . . g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zitronensäure . . . . . g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kalziumoxalat . . . . . g	0,130	0,087	0,050	**0,089**	0,373	0,993	0,214	0,661	0,182	0,807
Oxalsäure . . . . . g	0,080	0,054	0,030	**0,055**	0,230	0,612	0,132	0,407	0,113	0,497
Glukose . . . . . g	1,50	1,59	1,28	**1,46**	0,53	0,21	0,36	—	—	—
Glukoseverbrauch . . . . g	3,50	3,41	3,72	**3,54**	4,47	4,79	4,64	5,00	5,00	5,00
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	72,5	80,1	83,6	**78,7**	62,6	74,4	66,3	64,2	53,7	45,6
Ausbeute an Zitronensäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	2,3	1,6	1,3	**1,7**	5,1	12,8	2,8	8,1	2,2	6,2
Myzeltrockengewicht . . mg	110,02	108,37	99,72	**106,04**	251,37	294,01	288,07	347,37	322,96	410,21
Stickstoffgehalt des Myzels mg	1,54	1,14	1,02	**1,23**	4,10	3,87	5,28	4,47	7,99	5,77
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen a. d. Trockengewicht	1,39	1,05	1,02	**1,15**	1,63	1,32	1,83	1,29	2,47	1,41

Nun könnte man einwenden, daß in dem oben aufgeführten Versuch das Ausbleiben der Zitronensäure nicht auf die abgeleiteten Stickstoffdifferenzen zurückzuführen ist, sondern durch die Kohlenstoffquelle bedingt wird. Wie die Tabelle 31 zeigt, ist die Glukose schon vollständig verbraucht, so daß der Pilz tatsächlich bei einem weiteren, durch Stickstoffzugabe angeregten Wachstum eben auf die Glukonsäure als Kohlenstoffquelle angewiesen ist. Nach den Befunden von Amelung (1927) und Bernhauer (1928) bildet der Pilz bei Darbietung von Glukonsäure als Kohlenstoffquelle weniger Zitronensäure als auf Glukose. Aus diesem Grunde wurden neue Versuche angesetzt, in denen teilweise wenigstens noch Glukose vorhanden war. In der Tabelle 32 blieb selbst bei Zugabe von 8 mg gebundenem Stickstoff die Anfangsstickstoffkonzentration der Myzelien unter 2,5 %, auch hier konnte keine Zitronensäure nachgewiesen werden.

Das Zustandekommen der Stickstoffkonzentration ist so zu verstehen, daß die verhältnismäßig große Myzelmasse von 106 mg (z. B. Tabelle 30, Mittelwert der Versuche Nr. 255—257) bei einer Zugabe von Stickstoff sogleich so energisch wächst, daß ein Stickstoffgehalt von über 2,5 % nicht erreicht wird. Anders ist es mit dem Myzel von einem geringeren Ausgangsgewicht, wie es in der Versuchsreihe 29 verwendet worden ist. Nimmt man statt 32- oder 40-tägigen Kulturen 16-tägige mit einem durchschnittlichen Myzelgewicht von 35 mg, so wird bei Zugabe von 4 mg Stickstoff trotz eines ebenfalls sehr kräftigen Zuwachses an Myzel der 2,5 % Wert überschritten. Bei einer Stickstoffkonzentration von 2,68 % erhält man analog dem Versuch Nr. 272, Tabelle 31, bereits Spuren von Zitronensäure. Durch die Zugabe von 6 und 8 mg gebundenem Stickstoff wurden Anfangskonzentrationen von 3,23 und 3,47 % erreicht, und eine Zitronensäureproduktion in quantitativ bestimmbarer Menge erhalten. Damit ist der einwandfreie Beweis geliefert, daß die Zitronensäurebildung von einer bestimmten Stickstoffkonzentration abhängig ist.

Es sei nochmals wiederholt, daß die Zitronensäurebildung erst einsetzt, wenn die Stickstoffaufnahme aufgehört hat, wodurch bei weiterem Wachstum eine Abnahme der Stickstoffkonzentration erfolgen muß. Die Grenze der Ausgangskonzentration, von der ab eine Zitronensäurebildung einsetzt, ist für den untersuchten *Aspergillus niger* Tübingen etwa 2,5 %. Unterhalb dieser Grenze bleibt eine Zitronensäureproduktion vollkommen aus, während sie

oberhalb dieser bald einsetzt. Was die quantitativen Beziehungen zwischen der Stickstoffkonzentration des Myzels und der gebildeten Zitronensäuremenge anlangt, so läßt sich vorläufig nur feststellen, daß die Zitronensäurebildung bei ansteigender Stickstoffkonzentration zunimmt. Eine konstant zahlenmäßige Beziehung besteht aber nicht.

Auf Grund dieser Resultate ist eine Erklärung meiner bisherigen Ergebnisse über die Zitronensäurebildung möglich. Einmal wird die Tatsache begreiflich, warum in den stickstoffreien Kulturen keine Zitronensäure auftrat, da, wie sämtliche Tabellen zeigen, niemals eine Stickstoffkonzentration von über 2,5 % erreicht wurde, und zweitens wird verständlich, warum in den Versuchen mit von vornherein zugegebenem Stickstoff nur in den ersten Kulturtagen eine Zitronensäureproduktion stattfindet, da eben auch nur dann die Stickstoffkonzentration den Wert von über 2,5 % zeigt. Vergleicht man die Werte der Versuchsreihe 27, der von vornherein 8 mg Stickstoff zugegeben worden waren, mit den Werten der Tabelle 29, so zeigt sich in der ersteren eine beinahe doppelt so hohe Ausbeute an Zitronensäure wie in der letzteren. Diese Differenz ist dadurch erklärbar, daß bei den von Anfang mit Stickstoff versehenen Kulturen die Konzentrationsphase von über 2,5 % länger andauert.

Als Abschluß dieser Versuche wurden endlich noch vier 16tägige Kulturen, die unter den Bedingungen der Luftstickstoffassimilation mit einem Kalziumkarbonatzusatz von 2,0 g und bei 30—32° C gezogen wurden, mit je 8 mg Stickstoff versetzt. Diese vier Versuche sollten darüber Aufschluß geben, ob die alkalische Reaktion einen Einfluß auf die Stickstoffassimilation bezw. auf die Stickstoffkonzentration der Myzelien zeigt. In der 4. Spalte der Tabelle 32 ist wiederum das Mittel der Analysen aus drei Versuchen ohne diesen Stickstoffzusatz und bei 16tägiger Versuchsdauer zusammengestellt, während die nächsten Spalten die Daten der mit Stickstoff versetzten Kulturen nach 3 und 6 Tagen Versuchsdauer enthalten. Diese Kulturen wurden, um die stets wieder beobachtete Ansammlung von Säuren in der Myzelschicht zu verhindern, zweimal täglich eine halbe Stunde durchlüftet. Die Analysen zeigen, daß in der Tat die Stickstoffkonzentrationsverhältnisse in den Myzelien andere als in saueren Nährlösungen sind, da offenbar die Stickstoffaufnahme gehemmt wird. Eine Zitronensäurebildung konnte in dieser Reihe mit Sicherheit nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 31. Versuchsreihe 31. Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	264	265	266	Mittel	267	268	269	270	271	272
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O				Zugegebene Stickstoffmenge = 4 mg		Zugegebene Stickstoffmenge = 6 mg		Zugegebene Stickstoffmenge = 8 mg	
Kulturdauer . . . . . Tage	40	40	40	40	3	6	3	6	3	6
Azidität . . . . . ccm	—	—	19,85	**19,85** ?	207,8	274,1	195,0	155,6	244,7	154,2
P_H	7,12	7,39	3,98	**6,16** ?	1,99	1,68	1,95	2,42	1,87	2,37
Kalziumglukonat . . . . . g	2,901	3,115	3,454	**3,157**	3,507	4,277	3,427	2,725	3,739	2,498
Glukonsäure . . . . . g	2,538	2,725	3,022	**2,762**	3,068	3,742	2,998	2,385	3,271	2,186
Kalziumzitrat . . . . . g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Spuren
Zitronensäure . . . . . g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„
Kalziumoxalat . . . . . g	0,400	0,375	0,412	**0,396**	1,634	1,951	1,692	1,582	1,910	1,625
Oxalsäure . . . . . g	0,247	0,231	0,254	**0,244**	1,007	1,202	1,042	0,977	1,177	1,001
Glukose . . . . . g	2,00	1,84	1,64	**1,83**	—	—	—	—	—	—
Glukoseverbrauch . . . . g	3,00	3,16	3,36	**3,17**	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	85,1	73,1	89,9	**82,7**	61,4	74,8	59,9	47,7	65,4	43,7
Ausbeute an Zitronensäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	8,2	8,6	7,6	**8,1**	20,1	24,0	20,8	19,5	23,5	20,0
Myzeltrockengewicht . . mg	64,27	65,73	70,32	**66,77**	237,43	330,75	245,00	328,17	291,72	385,33
Stickstoffgehalt des Myzels mg	0,65	0,73	0,74	**0,71**	4,46	3,59	6,14	3,71	7,98	4,31
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen a. d. Trockengewicht	1,02	1,11	1,05	**1,06**	1,88	1,08	2,51	1,13	2,80	1,12

Tabelle 32. Versuchsreihe 32.

Versuch Nr.	273	274	275	Mittel	276	277	Mittel	278	279	Mittel
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 2,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O. Temperatur: 30—32° C				Zugegebene Stickstoffmenge = 8 mg. Temperatur: 20—22° C			Zugegebene Stickstoffmenge = 8 mg. Temperatur: 20—22° C		
Kulturdauer . . . . . Tage	16	16	16	16	3	3	3	6	6	6
Azidität . . . . . ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pH	7,59	7,62	7,63	**7,61**	7,53	7,34	**7,43**	7,15	7,08	**7,11**
Kalziumglukonat . . . . g	0,988	1,144	1,056	**1,063**	2,245	2,095	**2,469**	4,560	4,133	**4,347**
Glukonsäure . . . . . g	0,864	1,001	0,924	**0,930**	1,964	1,833	**2,133**	3,990	3,786	**3,888**
Kalziumzitrat . . . . . g	—	—	—	—	—	—	—	—	Spuren?	—
Zitronensäure . . . . . g	—	—	—	—	—	—	—	—	„	—
Kalziumoxalat . . . . . g	0,070	0,083	0,110	**0,088**	0,371	0,297	**0,334**	1,397	1,511	**1,454**
Oxalsäure . . . . . g	0,043	0,051	0,068	**0,054**	0,229	0,182	**0,205**	0,861	0,931	**0,896**
Glukose . . . . . g	4,05	3,79	3,76	**3,87**	2,05	1,72	**1,88**	0,23?	0,44?	**0,33**
Glukoseverbrauch . . . . g	0,95	1,21	1,24	**1,13**	2,95	3,28	**3,08**	4,77?	4,56?	**4,66**
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	91,0	82,7	74,5	**82,7**	66,6	55,9	**61,2**	83,8	83,0	**83,4**
Ausbeute an Zitronensäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen a. d. Glukoseverbrauch	6,8	4,3	5,5	**5,5**	7,7	5,5	**6,6**	18,0	20,4	**19,2**
Myzeltrockengewicht . . mg	24,71	30,12	28,09	**27,64**	188,07	205,01	**196,54**	297,49	278,34	**287,92**
Stickstoffgehalt des Myzels mg	0,27	0,31	0,30	**0,29**	4,74	5,43	**1,08**	6,01	5,37	**5,69**
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen a. d. Trockengewicht	1,11	1,02	1,08	**1,07**	2,52	2,65	**2,58**	2,02	1,93	**1,97**

Dies scheint also die Ergebnisse anderer Autoren zu bestätigen, daß die Zitronensäurebildung im allgemeinen nur bei saurer Reaktion des Nährmediums stattfindet. Allerdings ist nun auch noch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß infolge der offenbaren Hemmung der Stickstoffassimilation bei alkalischer Reaktion die Stickstoffkonzentration der Myzelien im Höchstwert nur eine Phase erreicht, bei der, wie z. B. hier bei dem *Aspergillus niger* Tübingen, selbst in saurer Lösung kaum eine Zitronensäurebildung einsetzt. Damit würde auch der Befund von Bernhauer (1926) eine zwanglose Erklärung finden, daß in alkalischer Lösung ebenfalls Zitronensäureproduktion eintritt, wenn genügende Mengen von Ammoniumchlorid vorhanden sind, indem anzunehmen ist, daß die gehemmte Stickstoffaufnahme bei Gegenwart von Kalziumkarbonat oder überhaupt in alkalischer Lösung durch größere zugegebene Stickstoffmengen kompensiert werden kann. Weiter würde sich auch dadurch erklären lassen, warum bei Zugabe von Kaliumnitrat statt Ammoniumchlorid die Zitronensäurebildung eine geringere ist, da ohne Zweifel mit der weniger guten Stickstoffquelle in Form eines Nitrats eine solche Kompensation verringert wird. Um allerdings ein genaueres Bild von dieser Hemmung der Stickstoffassimilation und der Abhängigkeit der Stickstoffkonzentration der Myzelien von den verschiedensten Faktoren zu erhalten, müssen weitere Versuche in dieser Richtung angestellt werden.

Die Versuche Nr. 278 und 279 zeigen hinsichtlich der Oxalsäurebildung noch etwas bemerkenswertes. Die Mehrproduktion an Oxalsäure nach der Stickstoffzugabe steht in keinem entsprechenden Verhältnis zu dem Myzelzuwachs innerhalb der ersten 3 Tage; d. h. die Oxalsäureproduktion ist gering, solange noch Stickstoff assimiliert wird. Bis zum 6. Kulturtage hat sich dieses Verhältnis zugunsten der Oxalsäure verschoben, indem bei geringerem Zuwachs an Myzel die Oxalsäurebildung erheblich stärker geworden ist. Mit der Einstellung der Stickstoffassimilation hat also die Oxalsäureproduktion zugenommen, ohne allerdings die Werte in sauren Medien zu erreichen. Dieselbe Erscheinung läßt sich überdies in sämtlichen letzten Versuchsreihen nachweisen.

Auch die Glukonsäurebildung nahm in den ersten drei Tagen an Intensität ab, wie die Prozentzahlen der Ausbeute, auf den Glukoseverbrauch bezogen, deutlich zeigen: trotzdem beträgt die Zunahme an dieser Säure in den ersten drei Kulturtagen nach dem Stickstoffzusatz noch über 1,0 g (Versuch Nr. 276 und 277,

Tab. 32), während sie in den analogen, aber sauren Nährlösungen (Versuch Nr. 249, 251 und 253, Tab. 29) sich kaum vermehrte. Nach sechs Kulturtagen aber mit zunehmendem Stickstoffhunger, nimmt die Glukonsäureproduktion wieder stark zu.

f) Säureproduktion der verschiedenen *Aspergillus*-Rassen.

Den Abschluß meiner Untersuchungen bildeten nun noch Versuchsreihen, die darauf ausgingen, die Säureproduktion der verschiedenen *Aspergillus*-Rassen in stickstoffreien Nährlösungen zu ermitteln. Dadurch wurde einmal die Ergänzung der schon im ersten Teil und durch die Normalkulturen im zweiten Teil der Arbeit gegebenen Charakteristik der Rassen vollendet und zweitens der Versuch gemacht, die an dem *Aspergillus niger* Tübingen gewonnenen Resultate auf eine breitere Basis zu stellen. Aus den

Tabelle 33. Versuchsreihe 33.

Temperatur: 20—22 ° C.

Versuch Nr.	280	281	282	283	284	285
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Aspergillus niger cinnamomeus*					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	133,7	220,3	224,9
p_H	—	7,60	7,48	2,34	1,72	1,76
Kalziumglukonat . . g	—	1,031	2,277	3,601	3,370	3,816
Glukonsäure . . . . g	—	0,902	1,992	3,150	2,949	3,338
Kalziumoxalat . . . g	—	0,159	0,284	1,142	1,854	1,763
Oxalsäure . . . . g	—	0,098	0,175	0,704	1,142	1,086
Glukose . . . . . g	—	3,99	2,67	1,23	1,36	1,10
Glukoseverbrauch . . g	—	1,01	2,33	3,77	3,64	3,90
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	89,2	85,5	83,6	81,0	85,6
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	9,7	7,5	18,7	31,2	27,8
Myzeltrockengewicht mg	—	25,94	54,03	95,80	111,19	119,71
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,69	1,59	1,72	1,65	1,41
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,16	0,43	1,47	1,36	1,50
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,60	1,31	2,81	3,21	3,19

orientierenden Vorversuchen des ersten Teiles meiner Arbeit hatte sich die Notwendigkeit ergeben, die Kulturen entsprechend der verschiedenen Alkali- und Säureresistenz der Pilzrassen unter verschiedenen Bedingungen anzusetzen, so daß jedem Pilz möglichst optimale Wachstumsbedingungen zur Verfügung standen.

Die Eigenart des am meisten verwendeten *Aspergillus niger* Tübingen ist aus den vorher angegebenen Daten in allen Einzelheiten ersichtlich.

Die Ergebnisse der stickstoffreien Kultur des *Aspergillus niger cinnamomeus mont.* sind in der Tabelle 33 dargestellt. Der Pilz verhält sich auch unter diesen Bedingungen dem Tübinger *Aspergillus* analog: Es tritt nur Glukon- und Oxalsäure auf, dagegen keine Zitronensäure.

Tabelle 34. Versuchsreihe 34.

Temperatur: 20—22 ° C.

Versuch Nr.	286	287	288	289	290	291
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Aspergillus niger fuscus*					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	9,86	188,7
p_H	—	7,58	7,42	7,45	4,30	1,91
Kalziumglukonat . . g	—	0,709	1,059	1,455	2,209	2,914
Glukonsäure . . . . g	—	0,620	0,927	1,272	1,933	2,549
Kalziumoxalat . . . g	—	0,130	0,199	0,280	0,751	1,849
Oxalsäure . . . . g	—	0,080	0,123	0,173	0,463	1,139
Glukose . . . . . g	—	4,26	4,02	3,67	2,77	1,64
Glukoseverbrauch . . g	—	0,74	0,98	1,33	2,33	3,36
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	83,8	94,6	95,7	86,9	75,9
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	10,8	12,5	13,0	19,8	33,9
Myzeltrockengewicht mg	—	18,53	29,45	38,04	81,79	104,72
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,28	1,41	1,61	1,48	1,29
Stickstoffgehalt der Nährlösung	—	0,14	0,16	0,16	0,74	0,77
Gesamtstickstoffassimilation	—	0,37	0,57	0,77	1,95	2,12

Der *Aspergillus niger fuscus mont.*, der sich in der Standardkultur relativ intermediär verhielt, zeigt lediglich etwas geringere Glukonsäurewerte (vgl. Tabelle 34).

Der stark alkaliempfindliche *Aspergillus niger ficuus* wurde unter stickstoffreien Bedingungen in den beiden nächstfolgenden Versuchsreihen 35 und 36 einmal bei 20—22° und einmal bei 30—32° ohne Karbonatzusatz kultiviert. Schon aus den Normalkulturen hatte sich sein hohes Oxydationsvermögen für Oxalsäure gezeigt, und obwohl in den stickstoffreien Kulturen die Rassendifferenzen weitgehendst verdeckt werden, wie sich aus den beiden vorhergehenden Beispielen schon zeigte,

Tabelle 35. Versuchsreihe 35.

Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	292	293	294	295	296	297
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Aspergillus niger ficuus*					
Kulturdauer . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	58,93	134,2	155,9	158,1	158,2
p_H	—	2,24	1,89	1,79	1,77	1,81
Kalziumglukonat . g	—	0,803	verunglückt	1,635	1,582	1,534
Glukonsäure . . . g	—	0,703	1,311[1])	1,430	1,384	1,342
Kalziumoxalat . . g	—	0,108	0,439	0,521	0,540	0,540
Oxalsäure . . . g	—	0,066	0,270	0,321	0,333	0,333
Glukose . . . . g	—	4,11	3,56	3,26	3,45	3,32
Glukoseverbrauch . g	—	0,89	1,44	1,74	1,55	1,68
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	79,0	91,0	82,2	89,3	79,9
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch .	—	7,5	18,8	18,4	21,4	19,8
Myzeltrockengewicht mg	—	33,92	51,23	65,41	59,58	56,13
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,10	1,19	1,04	1,09	1,01
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,42	0,60	0,68	0,84	0,79
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,79	1,21	1,36	1,49	1,35

1) Aus der Azidität berechnet.

ist diese Eigentümlichkeit des Pilzes auch unter diesen Bedingungen in beiden Kulturreihen noch angedeutet (vgl. Tabelle 35 und 36).

Tabelle 36. Versuchsreihe 36.
Temperatur: 30—32° C.

Versuch Nr.	298	299	300	301	302	303
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Aspergillus niger ficuus*					
Kulturdauer . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	32,51	66,74	159,2	214,0	227,4
p_H	—	3,65	2,48	2,24	2,09	1,86
Kalziumglukonat . . g	—	—	1,357	3,157	4,511	4,320
Glukonsäure . . . . g	—	0,494 [1]	1,187	2,762	3,947	3,867
Kalziumoxalat . . . g	—	Spuren	Spuren	Spuren	0,042	0,130
Oxalsäure . . . . g	—	"	"	"	0,026	0,080
Glukose . . . . . g	—	4,43	3,30	1,39	—	—
Glukoseverbrauch . . g	—	0,57	1,70	3,61	5,00	5,00
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	85,8	69,8	76,5	78,9	77,3
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	—	—	—	0,5	1,6
Myzeltrockengewicht mg	—	55,92	89,14	118,94	138,24	141,72
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,03	1,32	1,16	1,08	1,04
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,63	0,92	1,38	1,58	1,40
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	1,20	2,09	2,77	3,08	2,87

Tabelle 37. Versuchsreihe 37.
Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	304	305	306	307	308	309
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 0,5 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Aspergillus niger* var. *altipes*					
Kulturdauer . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	148,3	178,3
p_H	—	7,56	7,24	7,19	2,64	2,08
Kalziumglukonat . . g	—	0,583	0,901	1,557	2,571	3,602
Glukonsäure . . . g	—	0,509	0,788	1,362	2,249	3,169

1) Aus der Azidität berechnet.

Tabelle 37 (Fortsetzung).

Kalziumoxalat . . . g	—	Spuren	0,075	0,196	0,732	0,758
Oxalsäure . . . . g	—	„	0,046	0,120	0,451	0,467
Glukose . . . . . g	—	4,47	4,08	3,48	2,12	1,41
Glukoseverbrauch . . g	—	0,53	0,92	1,52	2,88	3,59
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	96,2	85,6	89,6	78,1	88,3
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	—	5,0	7,9	15,7	13,0
Myzeltrockengewicht mg	—	11,81	29,11	44,13	103,47	139,79
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,26	1,49	verunglückt	1,22	1,16
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,09	0,14	desgl.	1,19	1,26
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,24	0,57	—	2,38	2,88

Tabelle 38. Versuchsreihe 38.
Temperatur: 30—32° C.

Versuch Nr.	310	311	312	313	314	315
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Aspergillus niger* var. *altipes*					
Kulturdauer . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	50,71	104,5	160,3	177,1	173,2
P_H	—	3,62	2,75	2,00	1,86	1,93
Kalziumglukonat . . g	—	—	1,800	2,841	3,003	2,932
Glukonsäure . . . g	—	0,851 [1])	1,575	2,486	2,628	2,565
Kalziumoxalat . . . g	—	Spuren	0,094	0,101	0,204	0,152
Oxalsäure . . . . g	—	„	0,058	0,062	0,126	0,093
Glukose . . . . . g	—	4,02	2,96	2,12	1,89	1,93
Glukoseverbrauch . . g	—	0,98	2,04	2,88	3,11	3,07
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	86,8	77,2	86,3	84,5	83,5
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . . .	—	—	2,8	2,2	4,0	3,0
Myzeltrockengewicht mg	—	28,49	64,22	89,46	107,10	112,76
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,27	1,17	1,33	1,25	1,16
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,24	0,87	1,15	1,28	1,33
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,60	1,62	2,35	2,61	2,63

1) Aus der Azidität der Nährlösung berechnet.

Der *Aspergillus niger* var. *altipes* wurde in der Versuchsreihe 37 auf Kulturlösungen mit 0,5 g Kalziumkarbonat bei 20—22° C und in der Reihe 38 in saurer Lösung bei 30—32° C angesetzt. Das ebenfalls relativ hohe Oxydationsvermögen, das der Pilz in den Standardkulturen gezeigt hatte, war auch hier wiederum angedeutet; aus dem Vergleich beider Tabellen ist ohne weiteres ersichtlich, daß die Oxalsäure hier ebenfalls gebildet, aber bei höherer Temperatur weiter oxydiert worden ist.

Wegen seiner geringen Säureresistenz wurde der *Aspergillus niger* Göttingen auf einer Nährlösung mit 1,0 g Kalziumkarbonatzusatz kultiviert. Verglichen mit den anderen Rassen fällt lediglich sein etwas geringerer Glukoseverbrauch und die geringere Glukonsäurebildung auf (siehe Tab. 39).

Tabelle 39. Versuchsreihe 39.
Temperatur: 20—22° C.

Versuch Nr.	316	317	318	319	320	321
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 1,0 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Aspergillus niger* Göttingen					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	—	—	71,12
pH	—	7,58	7,43	7,45	7,05	3,05
Kalziumglukonat . . g	—	1,125	1,596	2,243	2,293	2,852
Glukonsäure . . . . g	—	0,984	1,397	1,963	2,006	2,495
Kalziumoxalat . . . g	—	verunglückt	0,341	0,449	0,587	0,935
Oxalsäure . . . . g	—	„	0,210	0,277	0,362	0,576
Glukose . . . . . g	—	3,80	3,33	2,61	2,41	2,19
Glukoseverbrauch . . g	—	1,20	1,67	2,39	2,59	2,81
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	82,00	83,6	82,1	77,4	88,8
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	—	12,6	11,6	14,0	20,5
Myzeltrockengewicht mg	—	32,54	57,43	80,00	72,58	140,08
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,08	1,25	1,26	1,11	1,07
Stickstoffgehalt der Nährlösung . . . . mg	—	0,15	0,17	0,25	0,41	0,77
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,50	0,89	1,27	1,44	2,27

Auch die Versuchsreihe 40 mit dem *Citromyces* P_{23} ergab hinsichtlich der Säurebildung keine grundsätzlich neuen Gesichtspunkte. Entsprechend seinem mangelhaften Wachstum ist die Glukonsäurebildung gering, während die Oxalsäureproduktion relativ reichlich ist.

Tabelle 40. Versuchsreihe 40.

Temperatur: 20—22 ° C.

Versuch Nr.	322	323	324	325	326	327
Zusammensetzung der Nährlösung	5,0 Glukose, 0,1 KH_2PO_4, 0,02 $MgSO_4$, 0,001 $FeCl_3$, 0,5 $CaCO_3$ zu 100 ccm H_2O					
Pilzstamm	*Citromyces* P_{23}					
Kulturdauer . . . Tage	8	16	24	32	40	48
Azidität . . . . ccm	—	—	—	17,20	69,98	82,51
PH	—	7,44	7,01	3,86	3,04	2,95
Kalziumglukonat . . g	—	0,626	0,794	1,192	1,448	1,404
Glukonsäure . . . . g	—	0,548	0,694	1,042	1,267	1,228
Kalziumoxalat . . . g	—	0,218	0,240	0,404	0,722	0,784
Oxalsäure . . . . g	—	0,135	0,151	0,249	0,445	0,483
Glukose . . . . . g	—	4,28	4,05	3,40	2,91	2,87
Glukoseverbrauch . . g	—	0,72	0,95	1,60	2,09	2,13
Ausbeute an Glukonsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	76,0	73,1	65,2	60,6	57,6
Ausbeute an Oxalsäure in % bezogen auf den Glukoseverbrauch . .	—	18,7	15,9	15,6	21,3	22,6
Myzeltrockengewicht mg	—	20,12	28,91	46,02	53,14	51,50
Stickstoffgehalt des Myzels in % bezogen auf das Trockengewicht . . .	—	1,58	1,96	1,82	1,51	1,44
Stickstoffgehalt der Nährlösung	—	0,20	0,15	0,46	0,65	0,75
Gesamtstickstoffassimilation . . mg	—	0,51	0,72	1,29	1,45	1,49

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Rassendifferenzen, die sich in den Normalkulturen genau und deutlich haben darstellen lassen, unter den stickstoffreien Bedingungen in weitgehendem Maße verwischt sind, so daß, wie oben schon einmal betont wurde, vermutlich die Grundeigenschaften der *Aspergillus*-Rassen in extremen Kulturbedingungen zutage treten. Man kann über die Versuchsreihen 33—40, was die Säurebildung der Rassen angeht, nur sagen, daß sie im großen und ganzen den bei den

Untersuchungen des *Aspergillus niger* Tübingen gefundenen Resultaten entsprechen, obwohl die Kulturen den jeweiligen Eigenschaften der Rasse (Säureresistenz und Alkaliempfindlichkeit) angepaßt unter verschiedenen Bedingungen gezogen wurden. Hiermit ist auch die Untersuchung der physiologischen Rasseneigentümlichkeiten beendet, die in ihrer Darstellung freilich nicht einheitlich sein konnte, sondern entsprechend der chemisch physiologischen Gliederung dieser Arbeit auf verschiedene Abschnitte verteilt werden mußte.

Abschnitt III.

Besprechung der Hauptergebnisse.

Bei der Assimilation atmosphärischen Stickstoffs werden Glukon- und Oxalsäure in großen Mengen gebildet. Die Glukonsäureproduktion erwies sich dabei nur in relativ geringem Maße abhängig von der $H^{\cdot}$-Konzentration der Nährlösung, da diese Säure sowohl bei saurer als auch bei alkalischer Reaktion in großer Menge gebildet wird; ihre Ausbeute beträgt dabei 70—90 % der verbrauchten Glukose. Da der Glukoseverbrauch nun seinerseits von der Entwicklung der Pilzdecken abhängig ist, ist naturgemäß die gebildete Glukonsäuremenge ebenfalls von der Myzelentwicklung abhängig. In der Tat ließ sich unter besonders günstigen Bedingungen der Myzelentwicklung bei der Luftstickstoffassimilation zeigen, daß hierbei sich auch die höchste Glukonsäureproduktion ergab.

Bei abnehmender Luftstickstoffassimilation infolge der Zugabe von 1 bis 2 mg gebundenem Stickstoff zu den Nährlösungen sinkt die Glukonsäurebildung stark ab. Daraus ist zu schließen, daß der Pilz seine Energie zur Assimilation des elementaren Stickstoffs in der Hauptsache aus der Oxydation der Glukose zu Glukonsäure bezieht. Mit weiteren Zugaben von gebundenem Stickstoff und bei eingestellter Luftstickstoffassimilation macht sich dann erst ein Einfluß der Reaktion der Nährlösung geltend, wie ihn Butkewitsch (1924) ermittelt hat, sofern nämlich mit fallender $H^{\cdot}$-Konzentration die Glukonsäureproduktion abnimmt und schließlich ganz aufhört. Allerdings hat dieser Befund durch die Ergebnisse Bernhauers (1926) eine Einschränkung insofern erfahren, daß bei relativ reichlich vorhandenem Stickstoff auch in steigenden $H^{\cdot}$-Konzentrationen keine oder nur geringe Mengen Glukonsäure gebildet werden. Aus diesen Resultaten folgt, daß die beobachtete

Abhängigkeit der Glukonsäurebildung von der Reaktion des Nährmediums nur eine sekundäre Erscheinung ist.

Was läßt sich nun aus diesen Ergebnissen zu dem Problem der Glukonsäurebildung sagen? Es ist außer Zweifel, daß diese Säure als erstes Oxydationsprodukt der Glukose aus dem Kohlenhydratstoffwechsel des Pilzes stammt; die Frage ist also aufzuwerfen, ob sie auch noch weiter im Kohlenhydratstoffwechsel verwendet wird, solange Glukose zur Verfügung steht[1]). Dies scheint aber nach meinen Ergebnissen meist nicht der Fall zu sein; vielmehr zeigte sich immer wieder mit Deutlichkeit, daß die Glukonsäureproduktion für den Pilz lediglich als Energiequelle in Frage kommt, woraus sich ergibt, daß die Glukonsäurebildung eine Funktion des Energiebedarfes darstellt. So ist auch die Glukonsäurebildung in karbonathaltigen Kulturen zu deuten; auch hier scheint der Energiebedarf des Pilzes höher zu sein, was auch der Tatsache entspricht, daß das Pilzwachstum bei alkalischer Reaktion gehemmt ist. Aus dieser Auffassung der Glukonsäureproduktion würde folgen, daß die Glukonsäure als Endprodukt dieser Form des Zuckerabbaues zu betrachten ist. Ist nun aber die Glukonsäure hier das Endprodukt, so muß man daraus schließen, daß der Pilz die Glukose auch noch in anderer Form anzugreifen vermag. Gewiß fehlen für diese Auffassung noch die experimentellen Unterlagen, aber die oben angeführte Vorstellung über die Glukonsäurebildung macht sie wahrscheinlich. Diese Hypothese würde gegen die Theorie von Butkewitsch über Atmung und intramolekulare Atmung und zugunsten derjenigen von Kostytschew sprechen, nämlich daß die ersten Schritte des Hexosenabbaues im wesentlichen Spaltungen und keine Oxydationen wären.

Hinsichtlich der Zitronensäurebildung haben die vorliegenden Untersuchungen mit *Aspergillus*-Rassen unter den Bedingungen der Luftstickstoffassimilation und mit Zugaben von geringen Mengen gebundenen Stickstoffs ebenfalls weitgehendste Abhängigkeit von dem Stickstoffstoffwechsel ergeben. Zunächst konnte das Resultat von Kostytschew u. Tschechnokov bestätigt werden, daß eine Zitronensäureproduktion nur bei sistierter Stickstoffassimilation eintritt, und ferner ließ sich als neu zeigen, daß die Bildung dieser

1) Daß die Glukonsäure als Kohlenstoffquelle für den Pilz verwendet werden kann, ist oft genug gezeigt worden, hat aber mit dem Sinn der hier erörterten Frage nichts zu tun.

Säure dabei auch von einer bestimmten Stickstoffkonzentration in den Myzelien abhängig ist. Da diese Stickstoffkonzentration aber nie bei der Luftstickstoffassimilation erreicht wird, wurde in Kulturen unter solchen Bedingungen auch keine Zitronensäure gebildet.

Bei diesen Untersuchungen über die Assimilation atmosphärischen Stickstoffs ergab sich schon, daß trotz großen Stickstoffmangels sich ein Teil des Stickstoffs in den Nährlösungen befand. Die Kulturen mit zugegebenem gebundenem Stickstoff unter den für die Zitronensäurebildung günstigsten Bedingungen ergaben das gleiche Resultat. Der Stickstoff wurde anfänglich vollkommen von dem Myzel aufgenommen, dann aber nach längerer Kulturdauer zum Teil wieder in die Nährlösung zurückgegeben. Dieser Befund deutet mit Sicherheit auf das Vorliegen proteolytischer Prozesse hin. Endlich ergab sich noch, daß bei alkalischer Reaktion des Nährmediums die Aufnahme gebundenen Stickstoffs zu anderen Konzentrationsverhältnissen in den Myzelien führt, als es bei solchen der Fall ist, die unter sonst ganz gleichen Bedingungen, aber in saurer Nährlösung herangezogen wurden.

Was ergibt sich nun aus diesen Resultaten für das Problem der Zitronensäurebildung? Während bezüglich der Glukonsäureproduktion sämtliche Autoren in der Auffassung übereinstimmen, daß diese Säure aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammt, steht das bezüglich des Problems der Zitronensäurebildung ganz anders. Hier ist überhaupt noch zu entscheiden, in welchem der verschiedenen möglichen Stoffwechselprozesse dieses Produkt entsteht. Im folgenden sollen die verschiedenen Theorien über die Zitronensäurebildung kurz wiederholt, und daran anschließend soll gezeigt werden, für welche davon meine Resultate einen Beitrag bezw. eine Entscheidung liefern. Erstens muß betont werden, daß die Zitronensäure kein intermediäres Produkt der normalen Kohlenhydratatmung ist, da dann die weitgehende Abhängigkeit ihrer Bildung von dem Stickstoff nicht zu verstehen wäre, wie sie sich besonders auch in diesen Untersuchungen so deutlich ergeben hat. Daß die Zitronensäure nicht immer entsteht, und daß bei dem Zusatz dieser Säure zu *Aspergillus*-Kulturen, solange Glukose vorhanden ist, diese nicht weiter verbraucht wird, spricht, wie Kostytschew hervorhebt, ebenfalls gegen eine solche Annahme. Weitere mehr theoretische Schwierigkeiten ergeben sich aus den Überlegungen über die chemische Realisierbarkeit des Bildungsprozesses. Eine

direkte Umwandlung der Kohlenhydrate in die Kohlenstoffkette der Zitronensäure ist nicht vorstellbar; man muß schon eine intramolekulare Umlagerung oder eine Synthese von Zuckerspaltprodukten annehmen. Die Theorie Butkewitschs, die eine intramolekulare Umlagerung über die Glukuronsäure annimmt, basiert auf keinerlei experimentellen Grundlagen. Außerdem vermag diese Theorie eine Zitronensäurebildung aus Pentosen nicht zu erklären. Für die übrigen Theorien, die über die Ketipin- oder Parasaccharinsäure führen, gilt derselbe Einwand, und außerdem ist die Bildung beider Säuren an alkalische Reaktion gebunden, die in der Pflanzenzelle nie vorhanden ist. Die Vorstellung Amelungs und Bernhauers, daß die Zitronensäurebildung durch Aufbau aus C_3-Ketten nach einem vorhergehenden Zerfall längerer Kohlenstoffketten in diese erfolgt, ist ebenfalls rein theoretischer Art. Die Schwierigkeit einer Erklärung der Abhängigkeit der Zitronensäurebildung von dem Stickstoff-Stoffwechsel sucht Bernhauer so zu erklären, daß er eine Beziehung zwischen dem Stickstoff und der Enzymproduktion annimmt. Zu dieser Annahme ist weder positiv noch negativ viel zu sagen; immerhin darf nicht außer acht gelassen werden, daß die Enzymproduktion auch bei ganz stickstoffarm ernährten Myzelien noch kaum eingeschränkt, eher gesteigert ist, wie die Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen. Inwieweit qualitative Unterschiede in der Enzymproduktion von verschiedenartiger Stickstoffernährung abhängig sind, entzieht sich bei dem derzeitigen Stande der Fermentforschung unserer Kenntnis. Diese Schwierigkeiten, die sich noch nachdrücklich durch den in dieser Arbeit geführten Nachweis einer Abhängigkeit der Zitronensäurebildung von einer bestimmten Stickstoffkonzentration im Myzel ergeben haben, nötigen diese Theorien zu verlassen und sich anderen zuzuwenden, deren Hilfsannahmen durchsichtiger sind.

Im Gegensatz zu den Theorien, welche die Zitronensäure aus respiratorischen Vorgängen herleiten, stehen nun diejenigen, die die Bildung der Zitronensäure in den Eiweißstoffwechsel verlegen. Wie schon erwähnt wurde, machte Kostytschew auf die Möglichkeit der Entstehung der Zitronensäure bei der Desaminierung aufmerksam, bei welcher Spaltprodukte, wie das Isoleuzin, entstehen, deren Kohlenstoffgerüste mit dem der Zitronensäure übereinstimmen. Die Fähigkeit einiger Schimmelpilze, die Aminosäuren hydrolytisch zu den entsprechenden Oxysäuren zu spalten, hat Mayer (Zeitschr.

f. physiol. Chem., Bd. 42, 1904, S. 59) nachgewiesen. Die Entstehung von Oxysäuren kann aber auch bei der oxydativen Desaminierung erfolgen, wie Neubauer u. Frommherz (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 70, 1911, S. 326) gezeigt haben, indem, z. B. wie bei der Hefe, die bei der oxydativen Desaminierung zuerst entstehende Ketosäure zu einer Oxysäure reduziert werden kann, obwohl im allgemeinen gerade bei der Hefe diese primär entstehenden Ketosäuren nach Ehrlich[1]) unter CO_2-Abgabe in Aldehyde bezw. nach Reduktion derselben in Alkohole übergehen. Tritt nun statt der Reduktion wie bei der Hefe eine Oxydation ein, nachdem aus den Ketosäuren die CO_2-Gruppe abgespalten worden ist, so entstehen an C-Atomen ärmere Karbonsäuren (Neuberg u. Karzcag, 1911). Bezüglich der weiteren rein chemisch-theoretischen Ableitungen der Möglichkeiten der Säurebildung aus den Spaltprodukten der Aminosäuren kann ich mich hier kurz fassen, da diese von Wetzel (1927) bereits ausführlich dargestellt worden sind.

Meine beiden wesentlichen Befunde, nämlich das Vorhandensein proteolytischer Vorgänge und die Abhängigkeit der Zitronensäurebildung von einer bestimmten Stickstoffkonzentration des Myzels, sprechen zweifellos für einen Zusammenhang mit dem Eiweißstoffwechsel. Das Vorhandensein des Stickstoffs in den Nährlösungen trotz Stickstoffhungers der Pilze kann auf nichts anderes hindeuten als auf eine Eiweißveratmung, die auch bei Gegenwart von genügenden Glukosemengen stattfindet. Nun ist das Auftreten der Zitronensäure vor allem an zwei Bedingungen geknüpft, und zwar erstens an das Einsetzen proteolytischer Prozesse und zweitens daran, daß beim Einsetzen der Proteolyse in den Myzelien eine bestimmte Stickstoffkonzentration vorhanden sein muß. Ist die zweite der beiden Bedingungen nicht erfüllt, wohl aber die erste, so tritt keine Zitronensäure, dafür aber Oxalsäure in großen Mengen auf, wie die stickstoffreien Kulturversuche zeigten. Ist ferner im Verlauf des Zitronensäurebildungsprozesses das Myzelwachstum auf Kosten des noch vorhandenen Zuckers soweit fortgeschritten, daß die notwendige Stickstoffkonzentration nicht mehr erreicht wird, so wird die Zitronensäurebildung eingestellt, und statt ihrer tritt wiederum eine Oxalsäureproduktion ein. Diese Daten sind kaum

1) Ehrlich, F. (Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 39, 1906, S. 4072; Bd. 40, 1907, S. 1027 und 2538; Bd. 44, 1911, S. 131; Bd. 45, 1912, S. 883; Biochem. Zeitschr., Bd. 2, 1906, S. 52; Bd. 63, 1914, S. 379).

anders zu deuten, als daß die Zitronensäure aus dem Eiweißstoffwechsel herstammt. Weiter zeigte sich eine Korrelation zwischen der Zitronen- und Oxalsäurebildung. Es fragt sich nun, wie dieses Verhältnis aufgefaßt werden kann. Jedenfalls haben meine Versuche ergeben, daß beim Auftreten der Oxalsäure nach anfänglicher Bildung von Zitronensäure diese nicht wieder verschwindet, sondern in der anfänglich gebildeten Menge liegen bleibt. An eine Weiteroxydation der gebildeten Zitronensäure zu Oxalsäure im Sinne Butkewitschs kann man also nicht denken; vielmehr müssen wir annehmen, daß beide Säuren im gleichen Stoffwechsel als Endprodukte entstehen und sich lediglich unter bestimmten Bedingungen ersetzen können. Genaueres über diese gegenseitige Beziehung der beiden Säuren läßt sich erst dann aussagen, wenn eine Erörterung der Resultate der Oxalsäurebildung erfolgt ist.

Ich wende mich jetzt der Annahme Kostytschews zu, die die Zitronensäurebildung in die Eiweißsynthese verlegt. Der Autor nahm an, daß bei mangelndem Stickstoff dessen Anlagerung in Form von Ammoniak an die bei der Eiweißsynthese dauernd aus den Kohlehydraten entstehenden Ketosäuren in nicht genügender Menge oder überhaupt nicht erfolgen kann und daß die so nicht abgesättigten labilen Ketosäuren zu Oxysäuren (Zitronensäure) reduziert werden. Diese Auffassung hatte viel für sich, solange man lediglich wußte, daß eine Zitronensäureproduktion erst bei sistierter Stickstoffassimilation eintritt. Da nun aber meine Versuche ergaben, daß eine bestimmte Stickstoffkonzentration der Myzelien für die Bildung dieser Säure nötig ist, aber ein Wachstum des Pilzes und infolgedessen eine Eiweißsynthese oder zum mindesten die Bildung der stickstoffreien Ausgangssubstanzen auch noch bei viel geringerer Stickstoffkonzentration stattfinden muß, so müßte nach Kostytschews Deutung unter letzteren Bedingungen eine im Verhältnis zum Myzelgewicht noch gesteigerte Zitronensäureproduktion zu erwarten sein. Da dies aber keineswegs zutrifft, ist die Hypothese der Verlegung der Zitronensäurebildung in die Eiweißsynthese wenigstens in dieser Form wohl aufzugeben.

Außer der Glukon- und der Zitronensäure entsteht in stickstoffreien bezw. stickstoffarmen Kulturen in großer Menge Oxalsäure. Im Gegensatz zu den beiden obigen Säuren wird sie aber leicht auch bei Gegenwart von Glukose weiter verbraucht, wenn man die Kulturbedingungen durch Erhöhung der Temperatur ändert.

Bei den einzelnen *Aspergillus*-Rassen ist dieses Vermögen, die Oxalsäure weiter zu oxydieren, jedoch sehr verschieden, so daß das Verhältnis von gebildeter zu angehäufter Säure bei den einzelnen Rassen sehr variiert. Durch Zusatz von Kalziumkarbonat zu den Nährlösungen unter stickstoffreien Kulturbedingungen ergab sich aber, daß die gebildeten Mengen im Verhältnis zu den entsprechenden Myzelien bei den verschiedenen Rassen ziemlich gleich waren. Der Anhäufung dieser Säure ist eine Grenze insofern gesetzt, als durch die von ihr hervorgerufene hohe Azidität das Myzelwachstum früher oder später je nach der Säureresistenz der betreffenden Pilzrasse eingestellt wird. Diese Säureresistenz der Pilzrasse wiederum ist eine sehr verschiedene, wie sich unter den extremen Bedingungen der Luftstickstoffassimilation besonders auffallend zeigte. Als wichtigstes Ergebnis ließ sich bezüglich der Bildung der Oxalsäure dartun, daß das Optimum ihrer Produktion in saurem p_H-Bereich des Nährmediums liegt, da sich die Mehrproduktion in sauren Kulturen unter Abfangbedingungen als erheblich höher erwies, als dem auch in sauren Kulturen erhöhten Myzelzuwachs entspricht. Durch geringe Stickstoffgaben wird dieser Effekt allerdings schon bald verdeckt.

Dieser Befund ist aber auch eine weitere Stütze für die Annahme, daß die Zitronen- und die Oxalsäure in ein und demselben Stoffwechselvorgang entstehen können. Daraus ergibt sich weiter, daß für die Bildung der Oxalsäure die gleichen Erwägungen wie für die der Zitronensäure gelten: wie bei der Desaminierung Karbonsäuren entstehen können, ist in den vorstehenden theoretischen Überlegungen über den Desaminierungsvorgang bereits auseinandergesetzt. Es gilt nun noch, sich eine Vorstellung davon zu machen, warum bei einer mittleren Stickstoffkonzentration in der Hauptsache Zitronensäure und bei einer geringeren Oxalsäure entsteht. Es wird vermutlich so sein, daß im ersten Fall in der Hauptsache spaltende Prozesse ablaufen, alsdann mit weiterer Stickstoffabnahme und höherem Energiebedarf dagegen die oxydativen Prozesse überwiegen. Für das Zutreffen dieser Auffassung lassen sich zwei Stützen anführen: einmal haben die Untersuchungen über die Luftstickstoffassimilation gezeigt, daß mit Abnahme gebundenen Stickstoffs und zunehmendem Energiebedarf die oxydativen Prozesse sich steigern, indem sie hier zu massenhafter Bildung von Glukonsäure führen. Andererseits haben die Untersuchungen über die Rassendifferenzen in den Normalkulturen ergeben, daß

alle diejenigen Stämme, die man als Glukonsäurebildner bezeichnen kann, diese ihre Eigenschaft einem höheren oxydativen Vermögen verdanken, das sich vor allen Dingen auch darin äußert, daß sie die gebildete Oxalsäure leicht weiter oxydieren können, im Gegensatz zu den Zitronensäurebildnern, deren spaltendes Vermögen offenbar überwiegt und die infolgedessen die Oxalsäure in weit größeren Mengen anhäufen. Es besteht demnach also zwischen spaltenden und oxydativen Prozessen ein Gleichgewichtszustand, der leicht nach der einen oder anderen Seite verschoben werden kann, sei es durch geringe Rassendifferenzen, sei es durch erhöhten Energiebedarf. Und so wird auch in dem Fall der Alternative zwischen Zitronen- und Oxalsäurebildung bei der Verschiebung dieses Gleichgewichtes zwischen spaltenden und oxydativen Prozessen die Stickstoffkonzentration im Myzel die entscheidende Rolle spielen.

Abschnitt IV.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Sämtliche untersuchten Rassen von *Aspergillus niger* vermögen den Luftstickstoff zu assimilieren.

2. Für eine Luftstickstoffassimilation und ein Myzelwachstum des *Aspergillus* ist das Vorhandensein einer leicht oxydierbaren Kohlenstoffquelle Bedingung.

3. Der gesteigerte Energiebedarf bei der Assimilation elementaren Stickstoffes hat eine äußerst erhöhte Säureproduktion zur Folge, die, der Säureresistenz des Pilzes entsprechend, früher oder später das Myzelwachstum zum Abschluß bringt.

4. Eine weitere Assimilation des Luftstickstoffs und ein weiteres Myzelwachstum wird aber nur durch die Entfernung dieser organischen Säuren ermöglicht; diese kann entweder durch ihre Neutralisation oder zum Teil durch erhöhte Temperatur erreicht werden.

5. Die höchste Myzelernte unter den Bedingungen der Luftstickstoffassimilation betrug nach 48 tägiger Kulturdauer 180 mg bei einem maximalen Stickstoffgewinn von etwas über 4 mg.

6. Ein Teil des assimilierten Stickstoffes befindet sich stets in der Nährlösung.

7. Die Zugabe von gebundenem Stickstoff hemmt die Assimilation des Luftstickstoffes derart, daß diese bei einem Zusatz

von 4 mg Stickstoff für den *Aspergillus niger* Tübingen beispielsweise eine untere Grenze erreicht hat, bei der kein Stickstoffgewinn mehr nachweisbar ist.

8. Die in den Kulturen unter den Bedingungen der Luftstickstoffassimilation produzierten Säuren bestehen ausschließlich in Glukon- und Oxalsäure; Zitronensäure wurde dagegen niemals gebildet.

9. Die Glukonsäurebildung ist als eine Funktion des Energieverbrauches anzusehen, da sie in saurer Lösung mit steigenden Zugaben von geringen Mengen gebundenen Stickstoffs rasch abnimmt.

10. Die Entstehung von Glukonsäure ist von der Reaktion der Nährlösung nahezu unabhängig.

11. Das Optimum der Oxalsäurebildung liegt bei saurer Reaktion der Nährlösung.

12. Der Befund von Kostytschew u. Tschechnokov, daß eine Zitronensäureproduktion erst bei sistierter oder gehemmter Stickstoffassimilation einsetzt, wird bestätigt.

13. Die Zitronensäurebildung ist von einer bestimmten Stickstoffkonzentration des Myzels abhängig.

14. Bezüglich der Bildung der Säuren bestätigen die Resultate dieser Arbeit die bisherige Auffassung, daß die Glukonsäure ein Produkt der Kohlenhydratatmung ist. Sie widersprechen der Auffassung, die auch die Zitronen- und Oxalsäure aus demselben Stoffwechsel herleitet, verweisen vielmehr nachdrücklich auf die Desaminierung als den Ort ihrer Entstehung.

15. Sämtliche Säuren sind als Endprodukte und nicht als Intermediärprodukte des Stoffwechsels anzusehen.

16. Bezüglich der Charakterisierung der Rassen ließ sich zeigen, daß extreme Kulturbedingungen die physiologischen Rassendifferenzen verdecken; diese sind offenbar nur peripherer Natur und lassen sich lediglich durch die mittleren Bedingungen der Normalkultur deutlich machen.

Diese Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Tübingen am Ende des Sommersemesters 1927 begonnen und im Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt gegen Ende des Sommersemesters 1929 abgeschlossen. Es sei mir zum Schlusse gestattet, Herrn Professor Dr. Oehlkers für die weitgehende Unterstützung und Förderung bei der Arbeit herzlichst

zu danken. Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. Lehmann für die freundliche Übernahme des Referates und die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Botanischen Institut zu Tübingen, Herrn Professor Dr. Gerlach für die gütigst zur Verfügung gestellte Mikrowage und endlich Herrn Professor Dr. Wehmer, Hannover, für die überlassenen *Aspergillus*-Rassen.

Verzeichnis der wichtigsten Literatur.

Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. 2, S. 181, 1910.

— — und Teruucki, Kulturversuche mit *Aspergillus niger* auf einigen Aminosäuren und Peptiden. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 47, S. 394, 1906.

Amelung, Beiträge zur Säurebildung durch *Aspergillus niger*. Ebenda, Bd. 166, S. 161, 1927.

Bauer und Frommherz, Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. Ebenda, Bd. 70, S. 326, 1911.

Benecke und Jost, Pflanzenphysiologie, Bd. 1, 1923.

Bernhauer, Über die Säurebildung durch *Aspergillus niger*. Biochem. Zeitschr., Bd. 172, S. 296, 313, 324, 1926; Bd. 197, S. 287, 1928.

— —, Zum Chemismus der Zitronensäurebildung der Pilze. Ebenda, Bd. 197, S. 309, 327, 1928; Bd. 202, S. 164, 1928.

— —, Über die Charakterisierung der Stämme von *Aspergillus niger*. Ebenda, Bd. 197, S. 278, 1928; Bd. 205, S. 240, 1929.

— — und Wolf, Zur Enzymchemie der durch *Aspergillus niger* bewirkten Säurebildungsvorgänge. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 177, S. 270, 1928.

Buchner und Wüstenfeld, Über Zitronensäuregärung durch Citromyceten. Biochem. Zeitschr., Bd. 17, S. 395, 1912.

Butkewitsch, Die Ausnützung des Peptons als Kohlenstoffquelle durch die *Citromyces*-Arten. Ebenda, Bd. 129, S. 445, 1922.

— —, Über die Bildung und Anhäufung der Oxalsäure in den *Citromyces*-Kulturen auf Salzen der organischen Säuren. Ebenda, Bd. 129, S. 464, 1922.

— —, Über die Bildung der Oxalsäure und des Ammoniaks in den Kulturen von *Aspergillus niger* auf Pepton. Ebenda, Bd. 129, S. 445, 1922.

— —, Über die Bildung der Zitronen- und Oxalsäure in den *Citromyces*-Kulturen auf Zucker und das Verfahren zur quantitativen Bestimmung dieser Säuren. Ebenda, Bd. 131, S. 327, 1922.

— —, Über den Verbrauch und die Bildung der Zitronensäure in den Kulturen von *Citromyces glaber* auf Zucker. Ebenda, Bd. 131. S. 338, 1922.

— —, Über die Bildung der Glukon- und Zitronensäure in den Pilzkulturen auf Zucker. Ebenda, Bd. 154, S. 177, 1924.

Czapek, Biochemie der Pflanzen, 1925.

Currie, The citric and acid fermentation of *Aspergillus niger*. Journ. of biolog. chem., Bd. 31, S. 15.

Duggar und Davis, Nitrogen fixation. Ann. of the Missouri Botanic. Garden, Bd. 3, S. 414, 1916.

Ehrlich, Die chemischen Vorgänge bei der Hefegärung. Biochem. Zeitschr., Bd. 2, S. 52, 1906.
— —, Zur Frage der Fuselölbildung der Hefe. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 39, S. 4072, 1906.
— —, Über das natürliche Isomere des Leucins. Ebenda, Bd. 40, S. 2504, 1907.
— —, Über die Vergärung des Tyrosins zu p-Oxyphenyläthylalkohol (Tyrosol). Ebenda, Bd. 44, S. 139, 1911.
— —, Über Tryptophol, ein neues Gärungsprodukt der Hefe aus Aminosäuren. Ebenda, Bd. 45, S. 883, 1912.
— —, Die asymmetrische und symmetrische Einwirkung von Hefe auf Racemverbindungen natürlich vorkommender Aminosäuren. Biochem. Zeitschr., Bd. 63, S. 379, 1914.
— —, Zur Frage der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 40, S. 1027, 1927.
— — und Jacobson, Über die Umwandlung der Aminosäuren in Oxysäuren durch Schimmelpilze. Ebenda, Bd. 44, S. 888, 1911.
Euler, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, 3. Teil, 1909.
Falk und van Beyma thoe Kingma, Methodisches und Prinzipielles zur Darstellung organischer Säuren auf biochemischem Wege mit Hilfe von Fadenpilzen. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 57, S. 915, 1924.
Falk und Kapur, Über Glukonsäurebildung durch Fadenpilze. Ebenda, Bd. 57, S. 920, 1924.
Folin und Wu, A system of Blood Analysis. Journ. of Biol. chem., Bd. 38, S. 87, 1919.
Franzen und Schmidt, Die Bildung der Zitronensäure aus Ketipinsäure. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 58, S. 222, 1925.
Iwanof, Untersuchungen über die Umwandlung stickstoffhaltiger Stoffe in der Hefe, 1919.
— —, Über die Eiweißspaltung in Hefen während der Gärung. Biochem. Zeitschr., Bd. 120, S. 25, 1921.
Kiliani, Darstellung von d-Glukonsäure. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Märzheft 1929.
Kostytschew, Pflanzenatmung, S. 135, 1924.
— —, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 1, 1926.
— — und Tschechnokov, Bildung von Zitronensäure und Oxalsäure durch *Aspergillus niger*. Planta, Bd. 4, S. 181, 1927.
Molliard, Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra*. Comptes rendus Acad. de Paris, Bd. 174, S. 881, 1922.
— —, Manière dont se comporte le *Sterigmatocystis nigra* vis-à-vis de diverses substances sucrées dans des milieus faiblement minéralisés. Ebenda, Bd. 178, S. 161, 1924.
Neuberg und Karczag, Über zuckerfreie Hefegärung IV. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe. Biochem. Zeitschr., Bd. 36, S. 68, 1911.
Parnas und Wagner, Über die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl. Biochem. Zeitschr., Bd. 125, S. 253, 1921.
Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse.
Pringsheim, Über die Stickstoffernährung der Hefe. Biochem. Zeitschr., Bd. 3, S. 171, 1907.
— —, Über die Fuselölbildung durch verschiedene Pilze. Ebenda, Bd. 8, S. 128, 1908.

Schiemann, Mutationen bei *Aspergillus niger* van Tieghem. Zeitschr. f. induktive Abstammungs- u. Vererbungslehre, Bd. 8, S. 1, 1912.

Ternetz, Über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch Pilze. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 44, S. 353, 1907.

Vogel, Die Assimilation des freien elementaren Stickstoffs durch Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakteriologie, II, Bd. 15, S. 33, 174, 215, 1906.

Wehmer, Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Ztg., S. 232, 1891.

— —, Über Zitronensäuregärungs-Pilze. Chemiker-Ztg., Bd. 33, S. 1281, 1909.

— —, Über Zitronensäurebildung aus Glyzerin durch Pilze. Ebenda, Bd. 37, S. 37, 1913.

— —, Verlust des Oxalsäurebildungsvermögens bei einem degenerierten *Aspergillus niger*. Centralbl. f. Bakteriologie, II, Bd. 49, S. 145, 1919.

— —, Über Fumarsäuregärung des Zuckers. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 51, S. 1663, 1918.

— —, Oxalsäure- und Zitronensäureentstehung in ihrer gegenseitigen Beziehung bei verschiedenen Rassen des Pilzes *Aspergillus niger*. Ebenda, Bd. 57, S. 1659, 1924.

— —, Bildung von Zitronensäure aus Glukonsäure durch Pilze. Ebenda, Bd. 58, S. 2616, 1925.

Wetzel, Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. Planta, Bd. 4, S. 476, 1927.

Windaus, Über Saccharinbildung aus Hexosen. Chemiker-Ztg., Bd. 29, S. 564, 1905.

Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmanns Gustav Schober und seiner Ehefrau Elise am 10. Januar 1902 zu Pforzheim geboren, besuchte ich, Richard Schober, zunächst die Volksschule und dann die Oberrealschule. Mit der Erlangung der Primareife widmete ich mich der Apothekerlaufbahn, indem ich zunächst die Praktikantenjahre in Pforzheim und das vorgeschriebene Jahr als Apothekerassistent in Cuxhafen, Bad Kreuznach und Zwickau i. S. ablegte.

Im Wintersemester 1923/24 begann ich an der Technischen Hochschule in Karlsruhe mein Pharmaziestudium, das ich ab Sommersemester 1925 an der Universität Tübingen fortsetzte. Nach abgelegtem Staatsexamen verbrachte ich ein weiteres Jahr als Praktikant bei dem Öffentlichen Untersuchungsamt der Stadt Pforzheim, um mich dann erneut dem Studium an der Universität Tübingen zu widmen. Ich belegte hauptsächlich die Vorlesungen und Praktika der Botanik neben solchen der Chemie und Physik und nahm im Sommersemester 1927 die vorliegende Arbeit unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Oehlkers in Angriff. Infolge Übernahme des Lehrstuhls für Botanik an der Technischen Hochschule in Darmstadt durch Herrn Prof. Dr. Oehlkers siedelte ich im Wintersemester 1928 mit an diese Hochschule über, wo ich diese Arbeit Ende Sommersemester 1929 zum Abschluß brachte.